ZUR FUNKTION DES GENETISCHEN APPARATES DER PLASTIDEN: NUKLEINSÄURESYNTHESE UND PLASTOMCODIERTE PROTEINE

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jürgen Schmitt

aus Weinheim

1978

1. Berichterstatter: Prof. Dr. [illegible]

2. Berichterstatter: Prof. Dr. [illegible]

Tag der mündlichen Prüfung: [illegible]

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. G. Herrmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Heber

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Februar 1978

Diese Arbeit ist in der stimulierenden Atmosphaere des Botanischen Instituts der Universitaet Duesseldorf entstanden:

Ich danke

Herrn Professor Dr. R.G.Herrmann fuer sein kritisches Interesse am Fortgang dieser Arbeit, das er durch zahlreiche Diskussionen und praktische Hilfe zum Ausdruck brachte,

Herrn Professor Dr. R.J. Ellis und Mrs. E.E. Forrester (University of Warwick, Coventry) fuer eine praktische Einfuehrung in die Methodik der Analyse von Fraction-1-Protein,

Herrn Professor Dr. W.Stubbe und seinen Mitarbeitern fuer die Bereitstellung von Oenothera-Material.

Viele Freunde und Kollegen haben mir geholfen, mir Rat gegeben und mich ermutigt. Ich danke Hans-Juergen Bohnert, Hajo Hoebertz, Regina Lehmann, Michael Koch, Christine Michalowski, Gabi Petersen, Barbara Schiller, Volker Stahl, Monika Streubel und Ulla Troeger.

Diese Arbeit wurde durch ein Graduiertenstipendium und aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefoerdert.

3H-TTP	Tritiummarkiertes Desoxythymidintriphosphat
3HdT	Tritiummarkiertes Desoxythymidin
CPM	Zaehlimpulse pro Minute
dA	Desoxyadenosin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dC	Desoxycytidin
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dG	Desoxyguanosin
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsaeure
DNAase	Desoxyribonuklease
EDTA	Aethylendiamintetraessigsaeure (Di-Natriumsalz)
p16,p32	Vorstufen der 16s bzw. 23s ribosomalen RNAs
PGA	Phosphoglycerat
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsaeure
RNAase	Ribonuklease
RUBPcase	Ribulose 1, 5 Bisphosphat-Carboxylase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsaeure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UPM	Umdrehungen pro Minute
u..	im Zusammenhang mit Einheiten: mikro...

Einleitung

Die autotrophe eukaryotische Zelle, das im Vergleich mit der prokaryotischen Zelle und und der heterotrophen Eukaryontenzelle wohl komplexeste genetische System, enthaelt drei Kompartimente - Zellkern, Plastide und Mitochondrium - die eigene genetische Information besitzen. Die Gesamtheit der Erbanlagen dieser Kompartimente wird jeweils als Genom, Plastom (Renner,1934) und Chondriom (Michaelis,1955) bezeichnet. Die Aufrechterhaltung des pflanzlichen Lebens ist von der genauen Abstimmung und dem Informationsaustausch zwischen diesen drei Systemen abhaengig.

Trotz dieser engen gegenseitigen Abhaengigkeit wurden diese drei genetischen Teilsysteme von den Disziplinen der Genetik und der Cytologie zu sehr verschiedenen Zeiten beschrieben. Waehrend das Verhalten des Genoms cytogenetisch durch die Chromosomentheorie der Vererbung schon frueh gut charakterisiert war, war die blosse Existenz des Plastoms und des Chondrioms bis zum Anfang der sechziger Jahre umstritten, obwohl die Erscheinungen "Nicht-Mendelnder" Vererbung bereits um die Jahrhundertwende erstmals untersucht worden waren (zur Uebersicht siehe Sager, 1972). Erste Schritte in Richtung auf die Aufklaerung der strukturellen und physiologischen Basis des genetischen Verhaltens des Plastoms und des Chondrioms wurden aber erst sehr viel spaeter durch die Entdeckung von Nukleinsaeuren in diesen Kompartimenten gemacht (Ris und Plaut, 1962;Chun et al.,1963;Sager und Ishida,1963). Ab dieser Zeit begann die molekularbiologische Analyse der extrakaryotischen Erbtraeger und damit im weiteren Sinne auch die der eukaryotischen Zelle.

Retrospektiv lassen sich zwei Phasen der molekularbiologischen Arbeit am Plastom unterscheiden: Forschungsschwerpunkte der ersten Phase waren der Nachweis und die Charakterisierung des Erbtraegers und der strukturellen Basis seiner Expression. Waehrend zum Beispiel die organelleigenen Ribosomen und ribosomalen RNAs durch ihr gegenueber den cytosolischen Komponenten verschiedenes Molekulargewicht verhaeltnismaessig leicht identifizierbar waren, gab es ueber die Identitaet und die physikochemischen Charakteristiken, insbesondere die Schwebedichte, der Plastiden-DNA jahrelange Konfusion (siehe zur Uebersicht z.b. Kirk,1971). In diese Forschungsphase fiel auch die Aufklaerung der cytologischen Organisation des Plastoms, an der in unserem Labor massgeblich gearbeitet wurde (zur Uebersicht siehe Herrmann et al.,1974; Kowallik und Herrmann,1974). Aus den wichtigsten Ergebnissen dieser ersten Forschungsphase laesst sich etwa das folgende - heute wohl allgemein akzeptierte - Bild entwickeln:

a.)Die physikochemischen Charakteristiken der Chloroplasten-DNAs hoeherer Pflanzen sind recht einheitlich. Ihre Schwebedichte im CsCl-Gradienten liegt bei allen bisher untersuchten Spezies um 1.697 g/ml. Das entspricht einem Gehalt von etwa 37 Molprozent Guanosin+Cytidin (zur Uebersicht siehe Tewari,1971). Bei Algen ist die Variationsbreite groesser. Sie liegt zwischen 1.685 bei Euglena und 1.696 bei

Acetabularia (Ray und Hanawalt,1964;Gibor,1967).

Die Chloroplasten-DNA traegt keine Histone. Sie hat einen im Vergleich zum Zellkern relativ geringen Informationsgehalt. Sie besteht aus ringfoermigen Molekuelen. Diese Molekuele sind bei allen bisher untersuchten Angiospermen etwa 45 um lang, was einem Molekulargewicht von 95 Megadalton entspricht (Manning et al.,1971,1972;Kolodner und Tewari,1972,1975;Herrmann et al.,1975). Bei der Chlorophycee Chlamydomonas reinhardii sind jedoch kuerzlich Zirkellaengen von 62 um gemessen worden (Behn und Herrmann,1977), bei Vaucheria sessilis, einer Xanthopycee und bei Sphaerocarpos donnellii, einem Lebermoos solche von etwa 37 um (Hennig und Kowallik, unveroeffentlicht;Herrmann et al.,1975b). Es gibt nach unserem jetzigen Kenntnisstand also keine eindeutigen Bezuege zwischen phylogenetischer Stellung und Laenge der Chloroplasten-DNA.

b.)Die chloroplasteneigenen Ribosomen sind kleiner als die cytosolischen und sie reagieren auf Inhibitoren, die auch gegen Bakterienribosomen wirksam sind.

Der genetische Apparat aehnelt also eher dem der Bakterien und Blaualgen als dem des Zellkern/Cytosol-Systems. Er wird daher als prokaryotisch bezeichnet.

c.)Plastiden hoeherer Pflanzen besitzen mehrere DNA-haltige Regionen in ihrem Stroma. Jede dieser Regionen wiederum enthaelt mehrere DNA-Molekuele. In einer einzigen Plastide kann die genetische Information bis zu etwa 50-fach vorhanden sein (Herrmann und Kowallik,1970;Kowallik und Herrmann,1972). Nimmt man fuer eine Mesophyllzelle eine durchschnittliche Anzahl von etwa 50 Chloroplasten an (Butterfass,1973), so enthaelt diese Zelle etwa 2500 Kopien der genetischen Information der Plastide. Diese hohe Redundanz kann als erhebliche genetische Pufferung aufgefasst werden und ist wohl einer der Faktoren, die Mutationsausloesung am Plastom so schwierig machen (Kutzelnigg,1972).

Die zweite Forschungsphase steht im Zeichen der feineren Struktur- und Funktionsaufklaerung des ringfoermigen Molekuels. Einen wesentlichen Fortschritt stellte hier die physikalische Kartierung mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen dar (Herrmann et al., 1976;Gray und Hallick,1976;Bedbrook und Bogorad,1976). Die Markierungspunkte, die durch die Schnittstellen sequenzspezifischer Enzyme gegeben sind, koennen als Referenzorte fuer die Lokalisation von Genen dienen. Eine Besonderheit in der Struktur der Chloroplasten-DNA aller bisher darauf untersuchter hoeherer Pflanzen, die durch die Kartierung aufgeklaert werden konnte, ist die Existenz eines verdoppelten Teilbereiches mit einem Molekulargewicht von etwa 15 Megadalton. Die verdoppelten Straenge sind 'Kopf an Kopf' angeordnet, getrennt von etwa 15 Megadalton 'single-copy' DNA (Bedbrook,1977;Hobom et al.,1977; Herrmann et al.,1976;Bedbrook und Bogorad,1976). Diese repetitive Sequenzinversion wurde ausserdem durch die unabhaengige Technik der Renaturierung ganzer Zirkel demonstriert (Tewari et

al.,1977). Auf ihr liegen zwei plastideneigene ribosomale Gene (Bedbrook und Bogorad,1976;Schmitt et al.,1977). Gene fuer verschiedene transfer-RNAs sind hingegen vorwiegend in 'single-copy'-Bereichen lokalisiert (Steinmetz, Driesel und Herrmann, unveroeffentlicht). Die ribosomalen 23s, 16s, 5s und 4.5s RNAs (Dyer und Bowman,1976;Driesel,1975;Whitfeld et al.,1977) belegen etwa 12% der Codierungskapazitaet der Chloroplasten-DNA.

Weitere Gene sind noch nicht sicher identifiziert. Die Frage nach der Funktion der restlichen 88% der Plastiden-DNA ist gegenwaertig wohl das zentrale Thema dieser zweiten Forschungsphase. Diese verbleibende Informationsmenge wuerde ausreichen um etwa 200 Proteine mit einem mittleren Molekulargewicht von etwa 20 Kilodalton zu codieren. Es ist allerdings ebenso moeglich, dass diese DNA-Bereiche nur zu einem geringen Teil Strukturgene enthalten und mehr an der Regulation des komplizierten Kern/Cytosol - Plastide - Mitochondrium - Zusammenspiels beteiligt sind. Die Aufklaerung dieser Frage nach dem relativen Anteil von Regulator- und Strukturgenen auf den extrakaryotischen Erbtraegern wird wahrscheinlich in den Problemkreis einer zukuenftigen dritten Forschungsphase ueberleiten, die wohl der molekularbiologischen Charakterisierung des Informationsflusses zwischen den Kompartimenten gewidmet sein wird. Es ist dabei nicht ausgeschlossen, dass neben der Interaktion zwischen den Organellen und dem Zellkern/Cytosol-System, die heute schon postuliert werden muessen, auch direkte genetische Kooperation zwischen Plastide und Mitochondrium existiert. Der Prozess der Photorespiration, der in diesen drei Kompartimenten ablaeuft mag als analoges Beispiel aus der Stoffwechselphysiologie dienen (Schnarrenberger und Fock,1976).

Die Probleme, die ich in dieser Dissertation bearbeitet habe, lassen sich der zentralen Frage nach der Funktion der Chloroplasten-DNA unterordnen. Ich habe diesen Fragenkomplex auf den drei Ebenen der DNA-Synthese, der Transkription im Organell sowie der Translationsprodukte bearbeitet.

Die Nukleinsaeuresyntheseleistungen der Plastiden habe ich unter besonderer Beruecksichtigung des morphologischen und physiologischen Zustands der Organellen charakterisiert und aus diesem Ansatz eine grundsaetzliche Kritik der bisher in der Literatur beschriebenen Versuche entwickelt. Bei den Translationsprodukten habe ich mich zunaechst auf die Charakterisierung des Fraction-1-Proteins bei Oenothera-Plastommutanten (Kutzelnigg und Stubbe,1974) konzentriert, dessen grosse Untereinheit im Organell synthetisiert wird (Blair und Ellis,1973) und dessen Strukturgen nach genetischen Daten von Chan und Wildman (1972) auf dem Chloroplasten-DNA Molekuel liegt. Den entsprechenden Kapiteln in dieser Arbeit ist jeweils eine ausfuehrliche Diskussion der Problematik vorangestellt.

Einzelne Teile aus dieser Arbeit sind auf verschiedenen Tagungen in Form von Abstracts, Postern oder Kurzvortraegen vorgestellt worden (Schmitt und Herrmann,1974; Bohnert und Schmitt,1974; Bohnert et al.,1974; Schmitt und Herrmann,1975; Bohnert et al.,1975; Herrmann et al.,1975b; Schmitt et al.,1977; Crouse et al.,1977).

Material und Methoden

Isolation von Chloroplasten mit intakten Huellmembranen

Keimlinge meist ohne Primaerblaetter oder junge Blaetter von Spinacia oleracea (var. Monnopa) oder Antirrhinum majus (var. New Times) wurden mit Haushaltsdetergens gewaschen und mehrmals mit entmineralisiertem Wasser gespuelt. Die Blaetter wurden dann fuer 10 Minuten bei 4 Grad in 1.3 % Natriumhypochlorit, 0.5 % Tween 80 sterilisiert und fuenfmal mit sterilem entionisiertem oder destilliertem Wasser gespuelt. Nach dem Abtropfen wurden die Blaetter auf 4 Grad gekuehlt. Medien wurden durch Membranfiltration (Sartorius 111 07, Porengroesse 0.2 um) sterilisiert, Gefaesse und Tuecher durch trockene Hitze (> 150 Grad fuer mehr als drei Stunden) oder durch UV-Bestrahlung.

Die Plastiden wurden nach einer modifizierten Vorschrift von Jensen und Bassham (1966) isoliert (Heber,1973). Eine Gewichtseinheit Blaetter wurde in einem doppelten bis dreifachen Volumen Medium 'A' fuer 7-10 Sekunden bei Hoechstgeschwindigkeit im Waring Blender homogenisiert. Das Homogenat wurde durch Nylongaze gepresst (Maschenweite 20 um, Schweizerische Seidengaze Fabrik AG, Zuerich) und anschliessend durch drei Lagen der gleichen Gaze gefiltert. Die Chloroplasten im Filtrat wurden 50-70 Sekunden im Ausschwingrotor bei 2000 x g zentrifugiert. Der Ueberstand wurde verworfen, das Sediment vorsichtig mit einer Auslaufpipette in wenigen ml Medium 'C' (Jensen und Bassham,1966) resuspendiert, mit weiterem Medium 'C' verduennt und die Chloroplasten nochmals fuer 40-60 Sekunden zentrifugiert. Der blassgruene Ueberstand wurde verworfen, das Sediment in 1-2 ml 'C' resuspendiert.

Die Mehrzahl der isolierten Chloroplasten erschien im Phasenkontrastmikroskop glaenzend (Kahn und von Wettstein,1961), im Interferenzkontrast dagegen glatt (Schmitt und Herrmann,1977). Organellen dieses Typs werden in der Literatur als intakt bezeichnet (z.b. Walker,1971; vergleiche auch Hall,1972). Wird in dieser Arbeit auf intakte Organellen Bezug genommen, so soll Intaktheit operational durch diese beiden Kriterien definiert sein. Zusaetzliche physiologische Intaktheitskriterien wie Impermeabilitaet der Huellmembranen gegen Hexacyanoferrat (Heber und Santarius,1970) oder Faehigkeit zur photosynthetischen Sauerstoffentwicklung (z.B. Walker,1971) sind im Text an den entsprechenden Stellen erwaehnt.

Nukleinsaeuresynthese in Chloroplasten

Zur Untersuchung der Nukleinsaeuresynthese wurden zwei in der Energieversorgung verschiedene Versuchsansaetze verwendet.

DNA-Synthese mit Triphosphat-Vorstufen

Der Basisansatz der triphosphatmediierten Inkorporationsversuche wurde nach Tewari und Wildman (1967) mit den beschriebenen Modifikationen durchgefuehrt (Schmitt,1973). Jede Probe enthielt osmotisch geschockte Chloroplasten entsprechend 30-100 ug Chlorophyll, 0.1-1 uCi 3H-Thymidin-Triphosphat (45 Ci/mMol, NEN), je 0.1 uMol Desoxycytidintriphosphat, Desoxyadenosintriphosphat, Desoxyguanosintriphosphat (Boehringer), 10 uMol Magnesiumchlorid und 4 mM Mercaptoaethanol in einem Gesamtvolumen von 150 ul. Traegermedium war Jensen und Basshams Medium 'C' (1966). Die Chloroplasten wurden bei 30 Grad im Dunkeln inkubiert.

Nukleinsaeure-Synthese mit Nucleosid-Vorstufen

Die Pflanzen wurden fuer 1-2 Tage dunkel gehalten. Sie wurden dann unmittelbar vor Versuchsbeginn fuer eine Stunde belichtet.

Chloroplasten entsprechend 30-100 ug Chlorophyll in Medium 'C' wurden in einem Gesamtvolumen von 150 ul in Eppendorfgefaessen mit 1 uCi 3H-Thymidin (41-52 Ci/mMol, Amersham) oder 3H-Desoxyadenosin (12 Ci/mMol, Amersham) oder 3H-Uridin (43 Ci/mMol, Amersham) bei 15 Grad inkubiert (Zusaetze siehe Text). Die Versuchsansaetze wurden mit einer Wolframlampe mit 30 Kilolux beleuchtet. Als Kontrollen dienten Dunkel- und Nullzeitproben. Fuer praeparative Zwecke wurden bis zu hundertfache Ansaetze in 100 ml fassenden Erlenmeyerkolben inkubiert.

Messung der Inkorporation

Um Pigmente und nicht eingebaute Vorstufen zu entfernen, wurden die Proben in TCA-haltigem (5%) 50% Methanol gefaellt, ueber Membranfilter (Sartorius 111 07) im Millipore Mehrfachfiltrationsgeraet (Typ 3025) gefiltert, dreimal mit je 10 ml TCA und einmal mit 10 ml Methanol gewaschen. Anschliessend wurden die hellbraunen Proben auf den Filtern ueber Nacht bei 50-60 Grad in 0.5 ml Soluene (Packard) und 0.1 ml Wasser solubilisiert und die Radioaktivitaet in Unisolve (Zinsser) unter Zusatz von 0.5 ml 2 N Salzsaeure im Szinillationsspektrometer (Packard 3320 oder Intertechnique SL 4000) bestimmt (Schmitt,1973;Bohnert et al.,1974).

DNA-Extraktion

Das Sediment der in Medium 'C' gewaschenen Plastiden wurde in einem zweifachen Volumen Saline-EDTA (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8) resuspendiert und mit 1% SDS (Endkonzentration) lysiert. Das Lysat wurde zweimal mit Phenol und zwei- bis dreimal mit Aether extrahiert. Anschliessend wurde es fuer 30 Minuten mit RNAase (50 ug/ml) und dann fuer 2 Stunden mit vorverdauter Pronase (1 mg/ml, beides bei Zimmertemperatur) inkubiert. Danach wurde erneut phenolisiert, die beiden Phasen durch Zentrifugation getrennt und die waessrige Phase gegen 0.2 x SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M Tri-Natriumcitrat, pH 7.2) dialysiert.

Gleichgewichtszentrifugation in Alkalisalzen

Die DNA-Loesungen wurden in festem CsCl auf einen Brechungsindex von 1.4000 (in Gegenwart von 100 ug/ml Aethidiumbromid auf 1.3880). Loesungen fuer Natriumjodidgradienten enthielten immer Aethidiumbromid (100 ug/ml) und wurden auf einen Brechungsindex von 1.4350 eingestellt. Die Loesungen wurden im Schwenkbecherrotor (Rotor 6x5 ml, bis zu 20 ug DNA je Roehrchen) zentrifugiert. Gleichgewichtszentrifugation wurde bei 20 Grad fuer 70 Stunden bei 33000 UPM durchgefuehrt, Relaxationsgradienten wurden fuer 2 Tage bei 36000 UPM, darauf fuer 2 Tage bei 26000 UPM zentrifugiert (Anet und Strayer,1969).

Die Gradienten wurden im ISCO-Gradientenfraktionator aufwaerts in Fraktionen von 0.1 ml zerlegt. Von Aliquots der Fraktionen wurde im Fluessigkeitsszintillationszaehler die Radioaktivitaet bestimmt. Die relative Menge von Kern- und Plastiden-DNA wurde von weiteren Aliquots in der analytischen Ultrazentrifuge bestimmt (Herrmann et al.,1975).

RNA-Extraktion

Nach dem Ende der Inkubation mit 3H-Uridin oder 3H-Adenosin wurden die Chloroplasten abzentrifugiert und die Nukleinsaeuren isoliert. Dazu wurde das Sediment durch Zusatz von 2% SDS, 2% Natriumdodecylsarkosinat, 150 mm NaCl, 150 mm Tris/Cl, pH 8.0, lysiert und mit einem gleichen Volumen Phenol geschuettelt (Parish und Kirby,1966). Die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt. Die waessrige Phase wurde mit der Interphase entnommen und noch einmal mit Phenol sowie zweimal mit Chloroform extrahiert. Sie wurde dann auf 0.1 M Natriumacetat gebracht, durch Zusatz von 2.5 Volumenteilen Aethanol bei -20 Grad gefaellt und zur Entfernung mitgefaellter Salze dreimal mit 0.1 M Natriumacetat in 70% Aethanol gewaschen. Das Sediment wurde in 40 mM Tris/Acetat 20 mM Natriumacetat, 1mM EDTA, 10% Saccharose, pH 7.2, aufgenommen. Die Trennung der RNA erfolgte ueber 2.4%

Acrylamidrundgele (0.6 x 10 cm) fuer 3.5 Stunden bei 3.5 mA/Gel (Bishop et al.,1967). Nach dem Lauf wurde die Extinktion der Gele bei 260 nm registriert (Beckman Acta 3 mit Gelscanner 2). Sie wurden dann mit Trockeneis eingefroren und in gefrorenem Zustand in 1mm Scheiben geschnitten. Die Scheiben wurden im Szintillationsgefaess mit 0.5 ml 20% TCA fuer 30 Minuten bei 90 Grad behandelt, um die RNA zu hydrolisieren. Die Radioaktivitaet der Proben wurde dann nach Zusatz von 8 ml Unisolve (Zinsser) im Fluessigkeitsszintillationszaehler bestimmt (Bohnert et al.,1974).

Nachweis von Fraction-1-Protein und RUBPCase-Aktivitaet

Blattspreiten von Oenothera wurden mit 5 Volumteilen Medium (s.u.) bei 0 Grad unter Zusatz von Seesand gruendlich gemoersert. Das Homogenat wurde durch Gaze mit 100 um Maschenweite oder durch mehrere Lagen Verbandmull filtriert. Das Filtrat wurde fuer 2-10 Minuten zentrifugiert (Eppendorf 3200). Das Sediment wurde verworfen.

Die RUBPCaseaktivitaet wurde nach Lilley und Walker (1974) bestimmt. Ihrem Medium wurde zum Schutz gegen schaedigende Gerbstoffe 2% PVP 10000 (Serva) zugefuegt.

Proben fuer den gelelektrophoretischen Nachweis von Fraction-1-Protein wurden in 50 mM Tris-Glycin, pH 8.5, 2% PVP 10000, 100 mM Mercaptoaethanol homogenisiert. Nach der Filtration und der Zentrifugation wurden sie ueber Nacht gegen 2.5 mM Tris-Glycin, pH 8.5, 100 mM Mercaptoaethanol dialysiert und entweder sofort untersucht oder mit 30% Saccharose versetzt und bei -20 Grad eingefroren.

Gelelektrophorese

Polyacrylamid-Gradientengele wurden als Platten mit den Dimensionen 82 x 82 x 2.7 mm im Pharmacia Giessapparat GSC-8 durch Mischung im Pharmacia GM-1 Gradientenformer gegossen (Margolis und Kenrick,1968). Der Gradientenformer produziert lineare Gradienten die im Giessapparat eine konkave Form annehmen. Die beiden Eckloesungen enthielten:

a.)4% Acrylamid, 0.08% Methylenbisacrylamid, 50 mM Tris-Glycin pH 8.5, 0.07% Kaliumpersulfat, 0.03% TEMED.

b.)20% Acrylamid, 0.4% Methylenbisacrylamid, 50 mm Tris-Glycin pH 8.5, 0.045% Kaliumpersulfat, 0.015% TEMED.

Die Gele wurden zunaechst elektrophoretisch mit Reservoirpuffer aequilibriert (eine Stunde, 250 V, 1000 Pulse/s, 0.1 uF mit einem Ortec Stromversorgungsgeraet). 2.5-75 ul Probe in 2.5 mM Tris-Glycin pH 8.5, 10-30% Saccharose, 100 mM Mercaptoaethanol und 0.01% Bromphenolblau wurden in die Geltaschen geschichtet. Die Trennung erfolgte bei 100 Pulsen/Sekunde (restliche Bedingungen wie oben) bis der Farbstoff ins Gel gewandert war. Die Pulsrate wurde dann auf 1000 erhoeht. Die Laufzeit war 10-14 Stunden, bei einer Reservoirtemperatur von 8 Grad.

Die Faerbung der Gele erfolgte nach Reisner et al. (1975) in Coomassie Blue/Perchlorsaeure. Schwache Banden wurden allerdings erst nach Entfaerbung in 5% Methanol, 5% Essigsaeure sichtbar.

Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Die Proben in Tris-Glycin- oder Natriumphosphatpuffer wurden in Gegenwart von 100 mM Mercaptoaethanol durch Zusatz von 3% SDS denaturiert und fuer 5 Minuten auf etwa 90 Grad erhitzt. Sie wurden anschliessend gegen 10 mM Natriumphosphat, 100 mM Mercaptoaethanol, 0.1% SDS, pH 7, dialysiert. Die Trennung erfolgte ueber Pharmacia 4/30 Gele, die zuvor elektrophoretisch mit Reservoirpuffer (20 mM Natriumphosphat, 0.1% SDS, pH 7) aequilibriert waren.

Die Proben (2.5-20 ul) wurden nach Zugabe von Saccharose und Bromphenolblau (s.o.) in die Taschen geschichtet. Der Einlauf erfolgte bei 400 V, 75 Pulsen/s und 0.1 uF. Zur Trennung wurde die Pulsfrequenz auf 500 erhoeht. Die Trennung erfolgte bei 20 Grad (Reservoirtemperatur) bis das Bromphenolblau das Gel auf der Anodenseite verlassen hatte.

Alternativ wurde das Puffersystem nach Laemmli (1970) benutzt. Das 'Spacergel' bestand aus 0.75% Agarose.

Die Plattengele wurden in 25% TCA fuer 30 Minuten fixiert und dann ueber Nacht in 7% Essigsaeure aufbewahrt. Die Faerbung erfolgte dann wie oben beschrieben.

Proteinbestimmung

Proteine wurden nach Warburg und Christian (1942) spektrophotometrisch bestimmt. Diese Bestimmung ist fuer Fraction-1-Protein in optisch klaren Loesungen der Bestimmung nach Lowry et al. (1951) vergleichbar (Rabinowitz et al.,1975).

Zusaetzlich wurde in einigen Versuchen die Methode von Kalb und Bernlohr (1977) verwendet, die auf spektrophotometrischen Messungen bei 260 nm und 230 nm Wellenlaenge basiert. Fuer gereinigtes Fraction-1-Protein von Oenothera stimmte dieser

Ansatz mit dem Warburgschen innerhalb von 20% ueberein.

Messung der CO2- und PGS-Reduktion

Die Sauerstoffentwicklung bei der CO_2 und PGS-Reduktion wurde polarographisch mit einer Clark-Elektrode in Gegenwart von 2 mM Substrat gemessen (Schaefer,1975).

Chlorophyllbestimmung

Chlorophyll wurde nach Arnon (1949) bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Nukleinsaeuresynthese

Chloroplasten-DNA ist ein stabiles genetisches Element der gruenen Pflanzenzelle und sie steht in einem genetisch praezise beschreibbaren Verhaeltnis zum Zellkern (zur Uebersicht siehe Kutzelnigg und Stubbe,1974). Es muss also Mechanismen geben, die den Erbtraeger erhalten und seine Information verfuegbar machen: Replikation und Transkription . Im Vergleich zu den Anstrengungen die der Strukturaufklaerung der Chloroplasten- DNA gewidmet waren (s.o.), ist ueber die Physiologie dieser beiden Prozesse noch recht wenig gearbeitet worden.

Aeltere in vitro Studien sind darueberhinaus oft schwer zu interpretieren, da der morphologische und physiologische Zustand der Organellen meist unzureichend definiert war. Wegen ihrer Bedeutung fuer die Kompartimentierung der betrachteten Reaktionen ist - wie unten gezeigt werden wird - der Zustand der beiden Huellmembranen des Organells von besonderem Interesse. Speziell die innere Membran uebt eine sehr spezifische Filterfunktion aus. Sie haelt manche Verbindungen fast vollstaendig zurueck (z.b. die meisten Makromolekuele, Saccharose, Sorbitol), waehrend sie fuer andere (z.b.Phosphat, Phosphoglycerat, Adenylate) Translokatoren besitzt, die einen kontrollierten Austausch der betreffenden Substanzen gestatten (Walker,1976). Auf diese Weise werden Metabolitenpools, also auch der Zutritt von DNA Synthesevorstufen sehr effektiv reguliert. Zur sinnvollen Beschreibung eines in vitro Experimentes ist es daher unerlaesslich, die Intaktheit der Organellen anzugeben.

DNA - Synthese

Der klassische Versuchansatz, mit dem DNA-Synthese in isolierten Chloroplasten nachgewiesen werden sollte, stammt von Tewari und Wildman (1967) und von Spencer und Whitfeld (1967,1969). Sie zeigten, dass isolierte Chloroplasten radioaktiv markierte Desoxyribonucleosidtriphosphate in ein saeurefaellbares, mit DNAase abbaubares Produkt ueberfuehren konnten und schlossen daraus, dass Plastiden eine eigene DNA-Polymerase besaessen. Inzwischen ist sowohl die Reinigung der Organellen wie auch die Charakterisierung der genetischen Komponenten der Plastide wesentlich verbessert worden (Kirk,1971;Herrmann et al.,1975; Schmitt und Herrmann,1977). Im Licht dieser neueren Resultate ergeben sich verschiedene Kritikpunkte, die ich im folgenden erlaeutern will.

Beide Gruppen, die DNA-Synthese beschrieben haben, benutzten im Reinigungsgang fuer die Organellen eine

Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. Das laesst immer darauf schliessen, dass die Mehrzahl der Organellen durch osmotischen Stress gebrochen war. In der Tat beschreiben Spencer und Whitfeld (1969) die verwendeten Chloroplasten als gebrochen, bei Tewari und Wildman fehlen entsprechende Angaben (Tewari und Wildman,1967).

Des weiteren ist die von diesen Autoren angewandte isopyknische Reinigung ueber Saccharose-Gradienten nur sehr unzureichend in der Lage, Kernmatrial aus den Plastiden zu entfernen. So konnte Herrmann (persoenliche Mitteilung) aus gradientengereinigten Chloroplasten neben der Chloroplasten-DNA noch bis zu 25 % Kern-DNA extrahieren, die vermutlich als Nukleoprotein an die Thylakoide gebunden ist. Da ausserdem sogar der Austausch von Makromolekuelen zwischen Kern und Plastide wegen der fehlenden Huellmembranen nicht ausgeschlossen ist, kann die Hypothese ausschliesslicher plastideneigener DNA-Synthese in diesem System ohne zusaetzliche experimentelle Evidenz nicht aufrechterhalten werden. Folgende Moeglichkeiten sind denkbar:

- Kern-Polymerase benutzt Kern-DNA als Primer
- Kern-Polymerase benutzt Chloroplasten-DNA als Primer
- Chloroplasten-Polymerase benutzt Chloroplasten-DNA als Primer
- Chloroplasten-Polymerase benutzt Kern-DNA als Primer
- alle Kombinationen dieser Moeglichkeiten

Ein mitochondrieller Beitrag an der beobachteten Polymerasereaktion wurde ausser acht gelassen, da Mitochondrien von Kernen und Plastiden durch differentielle Zentrifugation relativ gut getrennt werden koennen. Obwohl also mitochondrielle Kontamination experimentell am ehesten ausgeschaltet werden kann (Schmitt und Herrmann,1977), bezeichneten Tewari und Wildman (1967) einen DNA-Typ als Chloroplasten-DNA, der im isopyknischen CsCl-Gleichgewichtsgradienten an der schweren Seite einer Hauptbande lag, also von dieser separierbar war. Diese Satelliten-DNA, deren Dichte spaeter mit 1.706 g/ml bestimmt wurde ordneten Tewari und andere Autoren spaeter jedoch der Mitochondrien-DNA zu (Tewari,1971).

Angesichts dieser Ungereimtheiten erscheint der Schluss der genannten Autoren, Chloroplasten besaessen eine eigene DNA-Polymerase zumindest voreilig. Eine Neuuntersuchung dieses Fragenkomplexes war daher notwendig.

Triphosphatabhaengige DNA-Synthese

Im Rahmen meiner Staatsexamensarbeit (1973) hatte ich das von Tewari und Wildman (1967) sowie von Spencer und Whitfeld (1967,1969) verwendete Triphosphatsystem charakterisiert und die experimentelle Evidenz dafuer angefuehrt, dass die in-vitro Inkorporation von 3H-TTP in DNA sowohl durch nukleaere wie durch chloroplasteneigene Polymerasen verursacht werden konnte (Schmitt,1973). Diese Moeglichkeit konnte ich nun durch ein Modellexperiment mit DNA-Polymerase aus E.coli ('Kornberg-Enzym') sehr stuetzen. Eine Steigerung des Einbaus bei Zusatz dieses Enzyms kann als experimenteller Nachweis dafuer gewertet werden, dass die DNA in Chloroplastenfraktionen fremden Polymerasen zugaenglich ist. In der Tat erhoehte sich der Einbau von 3H-TTP in isolierte, geschockte Chloroplastenfraktionen, der im Vollsystem zwischen 5 und 20 pMol/mg Chlorophyll/Stunde betrug, bei Zugabe dieses Enzyms betraechtlich (Tab.1).

Wurde die gleiche Menge 'Kornberg-Enzym' einer Plastidenpraeparation zugegeben, die zu einem hohen Prozentsatz intakte Chloroplasten enthielt, so war der Einbau wesentlich geringer. Die Primer-DNA fuer die fremde Polymerase ist also nicht ausschliesslich Kern- sondern zumindest teilweise Plastiden-DNA.

Tabelle 1: Einfluss von E.coli DNA-Polymerase auf den Einbau von 3H-TTP in isolierte Chloroplasten. Die Werte sind bezogen auf den Einbau in osmotisch geschockte Plastiden, der 100 % gesetzt wurde.

osmotisch geschockte Chloroplasten	100%
osmotisch geschockte Chloroplasten + 0.16 Einheiten DNA-Polymerase	1600%
intakte Chloroplasten	7%
intakte Chloroplasten + 0.16 Einheiten DNA-Polymerase	180%

Solche Experimente geben natuerlich keine Hinweise ueber den Ort der DNA-Eigensynthese in Chloroplastenfraktionen. Grundsaetzlich kann nur eine Synthese im intakten Organell die Hypothese plastideneigener Polymerase stuetzen. Ich untersuchte daher die Abhaengigkeit des 3H-TTP-Einbaus von der Intaktheit der Chloroplasten.

Wie in Abb. 1 dargestellt ist, war die Synthese der Intaktheit umgekehrt proportional. Extrapoliert man die Kurve auf 100 % Intaktheit (unterbrochene Linie in Abbildung 1), so zeigt sich, dass intakte Chloroplasten ueberhaupt nicht einbauen. Die wahrscheinlichste Erklaerung dafuer ist wohl, dass die Vorstufen die Huellmembranen nur schwer oder garnicht ueberqueren koennen (Heldt,1976).

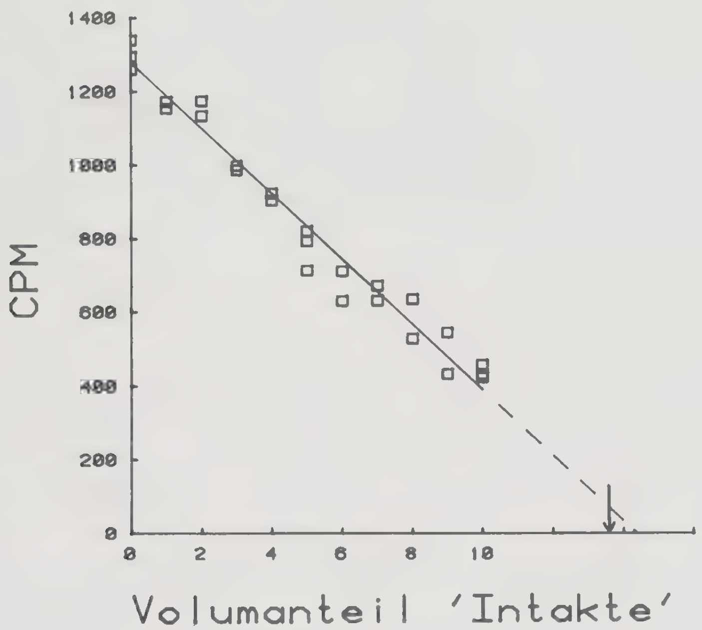


Abbildung 1: Abhängigkeit des 3H-TTP Einbaus vom Anteil intakter Chloroplasten. Die Abszisse gibt den Volumenanteil der intakten Plastiden an, der mit osmotisch geschockten Plastiden aus der gleichen Praeparation ad 10 Volumteile gemischt wurde. Der Chlorophyllgehalt war fuer die intakte und die geschockte Praeparation identisch. Die Intaktheitsbestimmung wurde nach Heber und Santarius (1970) mit einem Aliquot der inkubierten Probe nach Versuchsende durchgefuehrt. Die Gerade wurde durch lineare Regressionsrechnung bestimmt (Regressionskoeffizient r=-0.98). Der Pfeil markiert '100% Intaktheit'.

Durch diesen Versuch wird das prinzipielle Dilemma deutlich, in diesem Versuchssystem plastideneigene DNA-Polymerase mit Triphosphatvorstufen nachzuweisen. Nur gebrochene Plastiden bauen den Tracer ein und diese sind - wie gezeigt wurde - fremden Polymerasen zugaenglich. Ein klarer experimenteller Nachweis plastideneigener DNA-Synthese ist daher in diesem Versuchssystem kaum moeglich. Eine weitere Erhaertung des Arguments der moeglichen Fremdsynthese bringt auch die Produktanalyse.

Produktanalyse

Fuer die Versuche zur Produktanalyse wurde Antirrhinum majus verwendet, da Kern-DNA und Chloroplasten-DNA bei diesem Objekt in der Dichte ausreichend unterschieden sind, sodass sie auch praeparativ nebeneinander nachgewiesen werden koennen (Kern-DNA: 1.691 g/ml, Chloroplasten-DNA: 1.697 g/ml ; Herrmann et al.,1975). Da das Aufloesungsvermoegen des CsCl-Gradienten nicht ausreichte, Kern- und Plastiden-DNA voellig voneinander zu trennen, wurde das Relaxationsgradientenverfahren mit NaJ als Gradientenmaterial verwendet. Dieses Verfahren nutzt als Trennprinzip den Diffusionsunterschied zwischen Makromolekuel und Mikroion aus. Die Trennqualitaet der entsprechenden Gleichgewichts- und Relaxationsgradienten in NaJ und CsCl illustriert Abbildung 2. Das Aktivitaetsprofil zeigt in der Tat, dass sowohl Kern- wie Plastiden-DNA markiert sind.

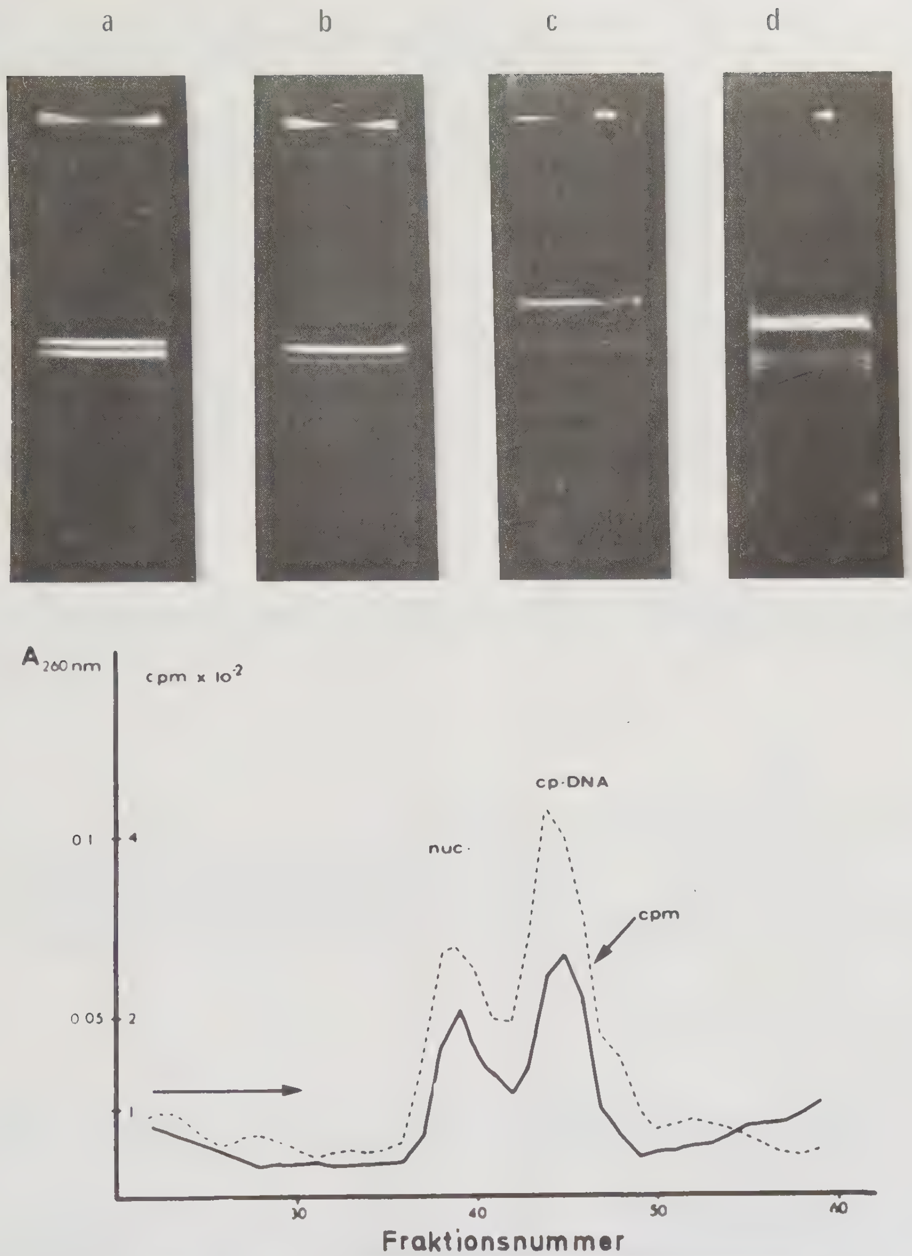


Abbildung 2: Produktanalyse des Triphosphatsystems. Das obere Bild zeigt vergleichend die Trennleistung von Alkalisalzgradienten. Die Proben waren ein Gemisch aus Poly dA/T, Kern- sowie Chloroplasten-DNA von Antirrhinum. Die mit Aethidiumbromid markierten DNAs wurden mit ultraviolettem Licht (254 nm) zur Fluoreszenz angeregt und im Zentrifugenbecher fotografiert. a):CsCl-Gleichgewichtsgradient b):NaJ-Gleichgewichtsgradient c):CsCl-Relaxationsgradient d):NaJ-Relaxationsgradient. Die Graphik zeigt die Markierung des Produkts triphosphatabhaengiger Synthese bei Antirrhinum nach NaJ-Relaxationsgradientenzentrifugation. Der Pfeil zeigt in Richtung des Schwerefeldes. cp-DNA: Chloroplasten-DNA; nuc-DNA: Kern-DNA.

DNA-Synthese mit Nucleosidvorstufen

Da der Einwand moeglicher nukleaerer Kontamination bei Versuchen mit Triphosphatvorstufen schwer auszuraeumen ist, musste ein Tracer ausgewaehlt werden, der die Huellmembranen der Chloroplasten permeieren kann. Desoxyribonukleoside (Desoxythymidin, Desoxyadenosin) erwiesen sich als geeignet(Tab. 2). Bevor die Nucleoside in DNA eingebaut werden koennen, muessen sie zunaechst in die unmittelbare, energiereiche Triphosphat-Vorstufe metabolisiert werden. Macht man sich dabei die Photophosphorylierung der Chloroplasten als Energiequelle zunutze, so lassen sich die Syntheseleistungen der Chloroplasten von denen der Kerne, Mitochondrien und etwaiger kontaminierender Bakterien diskriminieren.

Tabelle 2: Einbau von 3HdA und 3HdT in isolierte intakte Chloroplasten. Je Probe wurden 1 uCi von jedem der Tracer eingesetzt.

	CPM
intakte Chloroplasten + 3HdA	4784
intakte Chloroplasten + 3HdT	5435
intakte Chloroplasten + 3HdA + 3HdT	8242

Charakterisierung der nucleosidabhaengigen Synthese

Die Inkorporation von Nucleosiden in Plastidenfraktionen unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von der triphosphatabhaengigen Synthese:

Besonders charakteristisch ist die Lichtabhaengigkeit, die in Tabelle 3 dargestellt ist. Wie zu erwarten war, ist im Gegensatz zum Triphosphatsystem im Nucleosidsystem eine Belichtung absolut notwendig. Die Dunkelsynthese betraegt nur etwa 5% des Vollsystems. Da die Lichtabhaengigkeit wie erwaehnt die in diesem System wohl beste routinemaessige Diskriminierung von Chloroplasten- und kontaminierenden Aktivitaeten bietet (s.u.), wurden in den im folgenden beschriebenen Versuchen immer Dunkelproben mitgefuehrt. Alle angegebenen Einbauwerte sind, soweit nicht anders vermerkt, auf diese Dunkelkontrollen korrigiert.

Die Lichtabhaengigkeit des Systems laesst sich praeziser als Abhaengigkeit von der Photophosphorylierung beschreiben. Dies beweist ein Experiment mit dem Elektonentransportentkoppler

Nigericin. Fuenfzig ng/ml hemmen die Synthesereaktion zu 94 % (Tab 3).

Da zum Einbau der Nucleoside in DNA ein Pool von energiereichen Adenylaten notwendig ist, sollte man erwarten, dass Plastiden ohne Huellmembranen wegen der Verduennung der benoetigten Cofaktoren und Intermediate keinen Einbau zeigen. In der Tat inkorporieren osmotisch geschockte Organellen im Vergleich mit intakten Chloroplasten der gleichen Praeparation nicht (bezogen auf Inkorporation zum Zeitpunkt 0;Tab. 3). Der Zusatz des Detergens Triton-X-100, das in einer Konzentration von 0.5 %, die Chloroplastenmembranen zerstoert, Kernmembranen in Gegenwart von Magnesium allerdings im wesentlichen unbeeiflusst laesst (z.B. Schmitt und Herrmann,1977), hemmt den Einbau im Nukleosidsystem zu 98%, im Triphosphatsystem hingegen nicht.

Auch in den Beduerfnissen nach Coenzymen und Cosubstraten erfordert das Nucleosidsystem weniger Zusaetze als das Triphosphatsystem und zeigt damit eine eher in-vivo-artige Charakteristik. Als Beispiel mag die unterschiedliche Magnesiumabhaengigkeit dienen. Da intakte Chloroplasten Magnesiumionen nicht ins Medium abgeben (Krause,1977), ist das Nucleosidsystem im Gegensatz zum Triphosphatsystem nicht magnesiumabhaengig. Eine Konzentration von 100 mM, die im Triphosophatsystem das Optimum darstellt, wirkt im Nucleosidsystem stark inhibierend. Zehn mM Magnesium foerdern die Inkorporation sehr schwach. Der letztgenannte Effekt scheint jedoch vom Material abhaengig zu sein, da er nicht immer beobachtet werden konnte.

Tabelle 3: Charakterisierung der DNA-Synthese mit Nukleosidvorstufen in isolierten Chloroplasten. Die Einbaurate betrug 0.5-2 pMol/mg Chlorophyll/Stunde. Die Werte sind auf ein Vollsystem bezogen, das 100% gesetzt wurde. Zusaetze beziehen sich auf 100 ul.

Vollsystem, intakte Chloroplasten	100%
Dunkelkontrolle (bezogen auf Nullwert)	2%
osmotisch geschockte Chloroplasten (bezogen auf Nullwert)	1%
+ 10 ug DNAase	84%
Chloroplasten nach Inkubation mit Ultraschall geschockt, dann 30 Minuten Inkubation mit 10 ug DNAase bei 0 Grad	30%
+ 10 ug DNAase + 2 ug Phosphodiesterase	70%
Chloroplasten nach Inkubation mit Ultraschall geschockt, dann 30 Minuten Inkubation mit 10 ug DNAase und 2 ug Phosphodiesterase bei 0 Grad	2%
Chloroplasten nach der Inkubation mit Ultraschall geschockt, dann 30 Minuten Inkubation mit 10 ug RNAase bei 0 Grad	101%
+ 10 mM MgCl2	110%
+ 100 mM MgCl2	29%
+ 500 ug Triton-X-100	2%
+ 5 ng Nigericin	6%

Das Nucleosidsystem wird im Gegensatz zum Triphosphatsystem durch vom Tracer verschiedene Nucleoside nicht stimuliert. Der Zusatz von Desoxycytidin wirkt sogar hemmend auf den Desoxythymidineinbau, waehrend Purinnucleoside den Einbau im wesentlichen nicht beeinflussen. Vermutlich sind fuer die Pyrimidinhemmung isosterische Effekte beim Membrantransport oder bei der Phosphorylierung verantwortlich. Zum optimalen Einbau sind also nach diesen Daten keine der in anderen Systemen ueblichen Zusaetze erforderlich (Tab. 4).

Tabelle 4: Der Einfluss von unmarkierten Desoxyribonukleosiden auf die Inkorporation von 3HdT.

Vollsystem	100%
+ je 0.16 uMol dA, dC, dG	34%
+ je 0.0016 uMol dA, dC, dG	104%
+ 1.6 uMol dA	107%
+ 1.6 uMol dC	28%

Unter diesen Bedingungen war die Einbaurate, die zwischen 0.5 und 2 pMol/mg Chlorophyll/Stunde betrug, bemerkenswert stabil. Im Gegensatz zum Triphosphatsystem, dessen Rate schon nach etwa 10-20 Minuten deutlich abfiel (Schmitt,1973), war die Rate im Nucleosidsystem auch nach zwei Stunden (laengste getestete Zeit) noch linear (Abb. 3).

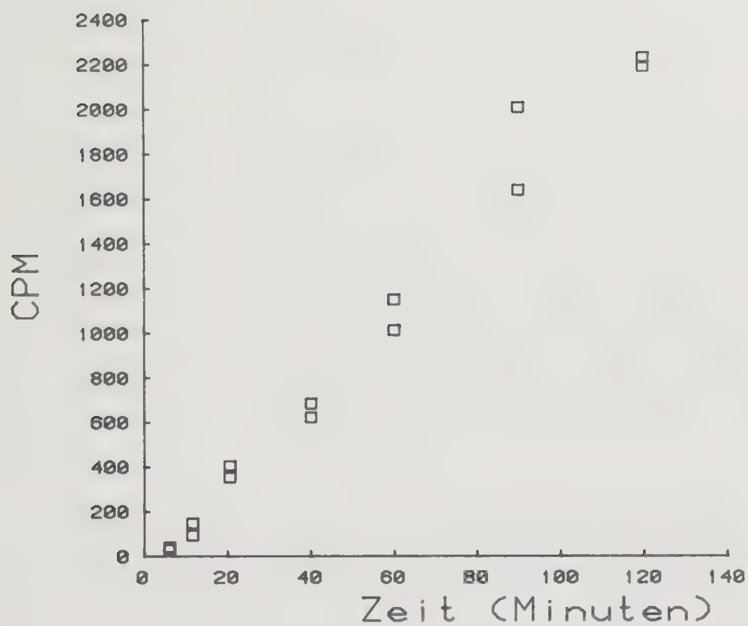


Abbildung 3: Abhaengigkeit des 3HdT-Einbaus von der Zeit.

Obwohl die genannten Ergebnisse starke Hinweise darauf enthalten, dass der Einbau von 3HdT in intakten Plastiden stattfindet, koennte man einwenden, dass der Tracer zwar in den Plastiden phosphoryliert, dann aber ueber die Membran exportiert und in einem anderen Kompartiment in DNA inkorporiert werden koennte. Um diesen Einwand auszuschliessen, fuehrte ich Versuche mit DNAase durch, die die Huellmembranen nicht ueberqueren kann (z.b. Wells und Birnstiel,1969; Herrmann et al.,1975). Der Einbau ist nur zu etwa 15% gegen DNAase empfindlich und findet daher in einem geschuetzten Kompartiment statt. Zerstoert man jedoch die Huellmembranen durch eine kurze Ultraschallbehandlung nach der Inkorporation, so lassen sich anschliessend 70 % des Einbaus in eine loesliche Form ueberfuehren. Setzt man zusaetzlich noch Phosphodiesterase zu, so wird 98 % der Inkorporation wieder abgebaut. RNAase hat dagegen keinen Effekt. Das Syntheseprodukt ist also DNA. Diese befindet sich in einem membrangeschuetzten Kompartiment, mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit in den Chloroplasten (Tab. 3).

Eine Reihe unterschiedlicher Ergebnisse spricht dafuer, dass Bakterien nicht fuer den Einbau verantwortlich sind. Bakterienzaehlung durch Ausplattierung ganzer Versuchsansaetze nach der Inkubation der Chloroplasten ergaben Maximalwerte von

etwa 200 Kolonien. DNA-Synthese in heterotrophen Bakterien ist in der Regel nicht lichtabhaengig; photosynthetische Bakterien als Kontaminanden auf Spinat sind unwahrscheinlich. Die Zellwand von Bakterien haelt gewoehnlich auch einem Ultraschallimpuls stand, der die Plastidenhuellmembran vollstaendig zerstoert. Auch 0.5 % Triton-X-100 sollte bakterielle DNA-Synthese nicht wesentlich inhibieren (Swinton und Hanawalt,1972).

Zur weiteren Charakterisierung der Reaktion fuehrte ich Versuche mit Inhibitoren der DNA-Synthese durch. Da hierbei nicht nur eine isolierte Reaktion, sondern der Endeffekt eines komplizierten biochemischen Zusammenspiels gemessen wird, treten hier allerdings Interpretationsschwierigkeiten auf. So kann zum Beispiel die mangelnde Hemmwirkung eines bestimmten Inhibitors auf Permeationsschwierigkeiten zurueckzufuehren sein, waehrend andererseits eine beobachtete Hemmung nicht unbedingt an der allgemein vermuteten Stelle in einem gegebenen Biosyntheseweg liegen muss. Ausreichende Kontrollen sind hier unbedingt erforderlich.

Als Testsubstanzen benutzte ich Aethidiumbromid, einen mit DNA interkalierenden Farbstoff und Mitomycin C, das nach Reduktion kovalente Bindungen zwischen den DNA-Straengen erzeugt. Der Angriffspunkt beider Inhibitoren liegt also an der DNA. Mitomycin ist in der Literatur bereits als Hemmstoff im Triphosphatsystem beschrieben (Tewari und Wildman, 1967). Es gelang mir allerdings nie - unter den verschiedensten experimentellen Bedingungen und mit Mitomycin aus verschiedenen Quellen - diese Hemmung zu beobachten(Schmitt,1973). Auch im Nucleosidsystem hatte Mitomycin keinen Effekt. Anders verhielt sich Aethidiumbromid. Zehn ug/ml hemmten den Einbau von Desoxythymidin zu 84 % (Tab. 5). Diese Hemmung bedeutet nicht notwendigerweise, dass der primaere Hemmeffekt bei der DNA-Synthese selbst liegt.

Um moegliche Nebeneffekte festzustellen, pruefte ich den Einfluss beider Substanzen auf die Phosphoglyceratreduktion. Dieses Testsystem ist besonders sensitiv, da sowohl der gekoppelte Elektronentransport wie auch einige Enzyme der Dunkelreaktion der Photosynthese zur Sauerstoffentwicklung noetig sind. Beide Inhibitoren hemmten die phosphoglyceratabhaengige Sauerstoffentwicklung (Tab. 8), was im Falle des Mitomycins als klarer Hinweis darauf aufgefasst werden kann, dass die mangelnde Hemmwirkung auf die DNA-Synthese nicht auf Permeabilitaetsbarrieren zurueckzufuehren ist. Die Hemmung des Nukleosidsystems durch Aethidiumbromid ist allerdings - wenn ueberhaupt - nur teilweise auf eine direkte DNA-Synthesehemmung zurueckzufuehren. Zwar ist die Hemmwirkung dieser Substanz auf die DNA-Synthese in einem System mit isolierter Mitochondrien-DNA-Polymerase und Mitochondrien-DNA als Primer recht gut belegt (Meyer und Simpson,1969). Sie wurde allerdings zur Hemmung der mitochondriellen DNA-Synthese in ganzen Zellen (Mattocia und Roberti,1974) und in isolierten Mitochondrien mit Nukleosidvorstufen (Ter Schegget und Borst,1971) verwendet. Angesichts der Hemmung von Photosynthesereaktionen durch diesen Farbstoff sollte die Hemmwirkung in vivo oder im Organell allerdings mit besonderer Vorsicht interpretiert werden. Bei der

Wirkung von Mitomycin C auf die PGS-Reduktion ist der Wirkort unklar. Es scheint jedoch die Photophosphorylierung genuegend intakt zu lassen, um die DNA-Synthese noch zu ermoeglichen.

Tabelle 5: Einfluss von Inhibitoren auf den Einbau von 3HdT.

Vollsystem	100%
+ 10 ug/ml Aethidiumbromid	16%
+ 50 ug/ml Mitomycin C	92%

Die Produktanalyse, die wie oben beschrieben durchgefuehrt wurde, stuetzte die oben gezogenen Schlussfolgerungen. In NaJ Relaxationsgradienten konnte nur eine radioaktive Bande von der Dichte der Plastiden-DNA gefunden werden, gleichgueltig ob die Plastiden mit DNAase behandelt worden waren oder nicht.

Die oben beschriebenen Daten stellen nach meiner Kenntnis den ersten stichhaltigen Nachweis von DNA-Synthese in isolierten intakten Chloroplasten dar. Es gelang damit, Synthese im Organell selbst nachzuweisen und gegen moegliche Artefakte zu diskriminieren. Der Modus der Reaktion - Replikation, Reparatursynthese oder terminale Anheftung - bleibt allerdings offen.

RNA-Synthese

Die RNA-Syntheseleistungen isolierter Chloroplasten sind besser charakterisiert als deren DNA-Syntheseleistungen. Aeltere Untersuchungen (Spencer et al.,1971) wurden allerdings ebenfalls an nicht intakten Chloroplasten mit Triphosphatvorstufen durchgefuehrt. Die grundsaetzlichen Nachteile eines solchen Versuchsansatzes habe ich oben bereits diskutiert.

Die RNA-Synthese ist anfaellig gegen schon geringe Variationen der Versuchsbedingungen. So wird in osmotisch geschockten Chloroplasten die fuer die RNA-Polymerase natuerliche Stromaumgebung durch ein kuenstliches Medium ersetzt, in dem die in-vivo Substrat- und Cofaktorkonzentrationen nur schwer zu simulieren sind. Solche unphysiologischen Medien behindern jedoch den geordneten Ablauf der RNA-Synthesereaktion, wobei die Teilprozesse der Initiation und der Termination als fehleranfaellig bekannt sind (Gilbert,1976).

- Die Initiation der RNA-Kette setzt eine zuverlaessige Erkennung der Promotorregionen auf der DNA voraus. Da sich verschiedene Promotoren in ihrer Affinitaet zur RNA-Polymerase unterscheiden und die Staerke der Promotor/Polymerase-Bindung stark salzabhaengig ist koennen Genregionen unter in-vitro Bedingungen fehlerhaft als Promotoren erkannt werden. Dieser Effekt tritt auch an Einzelstrangbruchstellen der DNA auf. Andererseits ist es moeglich, dass echte Promotoren die Polymerase nicht zu binden vermoegen.

- Fuer die Termination des primaeren Genprodukts gilt entsprechendes. Sowohl zu frueher Abbruch der Transkription wie irrtuemliches Ueberlesen einer Terminatorsequenz koennen auftreten.

Die genannten Fehler aeussern sich in einem heterogenen Produktmuster, was bei gelelektrophoretischen Untersuchungen der Produkte triphosphatabhaengiger RNA-Synthese in isolierten Chloroplasten in der Tat eine breite Verteilung der Radioaktivitaet ueber das Gel ergibt (z.b. Spencer et al.,1971).

Um solche Artefakte zu vermeiden benutzten Hartley und Ellis (1973) unabhaengig einen Ansatz, der zur gleichen Zeit in unserem Labor zum Studium der DNA-Synthese entwickelt worden war, naemlich den oben beschriebenen lichtabhaengigen Einbau von Nucleosidvorstufen in intakte Chloroplasten. In diesen stromahaltigen Plastiden sollte es moeglich sein, ein quasi natuerliches Milieu zu erhalten, wodurch sowohl die Genauigkeit der Ablesung als auch die Aktivitaet der beteiligten Enzyme dem in-vivo Zustand angenaehert bleiben sollte. Ein wesentlicher Unterschied zu dem oben beschriebenen DNA-Synthesesystem lag allerdings darin, dass Hartley und Ellis die Inkubation in einem Medium durchfuehrten, das eine sehr hohe Konzentration an einwertigen Kationen (200 mM KCl) enthielt. Kaliumchlorid kann die Huellmembranen der Plastiden nicht durchdringen (Heber und Purczeld,1977). Es zerstoert in dieser Konzentration jedoch die

CO_2-Reduktion schon innerhalb kurzer Zeit (Tab. 6). Hartley und Ellis konnten allerdings mit diesem Ansatz im Gegensatz zum Triphosphatsystem erstmals ein definiertes Syntheseprodukt fassen. Angesichts der physiologischen Inkompetenz der von ihnen verwendeten Plastiden schien es sinnvoll, ihre Ergebnisse unter Bedingungen zu ueberpruefen, unter denen das Organell funktionell besser erhalten ist, und in seiner physiologischen Kapazitaet bezogen auf die Photosynthese den in-vivo Leistungen nahekommt.

Tabelle 6: Einfluss von hohen KCl-Konzentrationen auf die lichtabhaengige CO_2-Fixierung.

Chloroplasten wurden mit 100 mM KCl in Medium 'C' versetzt. Um das osmotische Milieu konstant zu halten wurde der Sorbitgehalt der KCl-Loesung entsprechend reduziert. Die CO_2-Fixierungsrate ist in uMol/mg Chlorophyll/Stunde angegeben.

Chloroplasten in Medium 'C'	88
+ 100 mM KCl fuer 10 min. bei 0 Grad	18
+ 100 mM KCl fuer 40 min. bei 0 Grad	4
Chloroplasten in Medium 'C' fuer 90 min. bei 0 Grad	32

Charakterisierung des Basissystems

Die grundlegenden Kennzeichen der lichtabhaengigen RNA-Synthese mit tritiierten Nukleosidvorstufen sind denen des DNA-Synthesesystems vergleichbar. Auch hier findet der Einbau der Vorstufe nur im intakten Organell und im Licht statt. Das laesst sich durch den Zusatz von RNAase sowie durch Kontrollen mit Dunkelproben und osmotisch geschockten Organellen zeigen (Tab. 7). Behandelt man Plastiden, die nach der Inkubation durch Ultraschall geschockt wurden mit RNAase (Tab. 7), so wird etwa 90% des zuvor eingebauten 3H-Uridins wieder saeureloeslich. Das Syntheseprodukt ist also RNA. Zusaetzliche Evidenz fuer diesen Befund ist unten im Abschnitt 'Produktanalyse' angefuehrt.

Kinetik

Wie in Abbildung 4 dargestellt, ist der Einbau von 3H-Uridin auch nach 3 Stunden noch linear abhaengig von der Zeit. Das System ist also im Vergleich zu beispielsweise den meisten in vitro Photosyntheseleistungen und zum Triphosphatsystem ausserordentlich stabil.

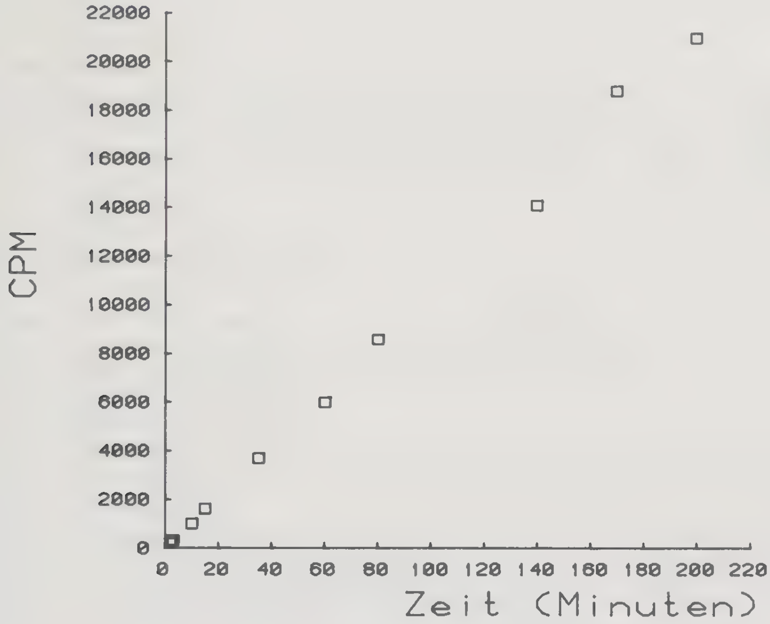


Abbildung 4: Abhaengigkeit des Einbaus von 3H-Uridin in intakte Chloroplasten von der Zeit.

Inhibitorwirkungen

Der Einbau von 3H-Uridin in Chloroplasten ist empfindlich gegen den Initiationshemmstoff Distamycin (Puschendorf,1971), den Elongationshemmstoff Chromomycin (Goldberg und Friedman,1971) sowie gegen Aethidiumbromid und Aktinomycin D, die beide die DNA interkalieren. Der Einbau ist unempfindlich gegen den Proteinsynthesehemmstoff Chloramphenicol und gegen den RNA-Synthesehemmstoff Rifampicin. Der letztgenannte Befund ist durch Permeationbarrieren der Huellmembranen allein nicht zu erklaeren, da auch Stoffe, welche die Permeabilitaet biologischer Membranen veraendern, wie Dimethylsulfoxid oder Dimethylformamid die Hemmwirkung von Rifampicin nicht vergroessern (Tab.7). Rifampicin hemmt bei Euglena die RNA-Synthese der Chloroplasten in vivo (Brown et al.,1970). In vitro konnte eine Hemmung jedoch nur in einem Teil der Faelle beobachtet werden (Carritt und Eisenstadt,1973).

Tabelle 7: Charakterisierung der RNA-Synthese mit Nukleosidvorstufen in isolierten Chloroplasten. Die Inkorporationsraten entsprechend 100% in der Tabelle lagen bei 50 pMol 3H-Uridin/mg Chlorophyll/Stunde. Mengenangaben der Zusaetze beziehen sich auf 100 ul.

Basissystem	100%
Nullzeitkontrolle	2%
Dunkelkontrolle	5%
osmotisch geschockte Chloroplasten	14%
+ 20 ug RNAase	104%
Chloroplasten nach Inkubation mit Ultraschall geschockt	
+ 30 Minuten Inkubation mit 20 ug RNAase (0 Grad)	11%
Chloroplasten nach Inkubation mit Ultraschall geschockt	75%
+ 0.2 ug Rifampicin	103%
+ 2 ug Rifampicin	97%
+ 1% Dimethylsulfoxid	94%
+ 1% Dimethylsulfoxid + 2 ug Rifampicin	108%
+ 5% Dimethylformamid	55%
+ 5% Dimethylformamid + 2 ug Rifampicin	57%
+ 2 ug Aethidiumbromid	10%
+ 0.2 ug Chromomycin A3	30%
+ 2 ug Chromomycin A3	27%
+ 0.2 ug Distamycin	68%
+ 2 ug Distamycin	22%
+ 1 ug Actinomycin D	53%
+ 0.1 ug d (-) threo-Chloramphenicol	100%
+ 1 ug d (-) threo-Chloramphenicol	111%

Fuer die Experimente mit Inhibitoren der RNA-Synthese gelten grundsaetzlich auch die Vorbehalte, die ich oben bei der Beschreibung der DNA-Synthese diskutiert habe. Auch hier kann die mangelnde Wirkung eines Inhibitors auf Permeabilitaetsschranken zurueckzufuehren sein, waehrend eine beobachtete Wirkung schon auf die Hemmung eines Primaerprozesses - beipielsweise des Elektronentransports oder der Phosphorylierung - zurueckzufuehren sein kann. Aus diesem Grund habe ich auch hier den Einfluss der verwendeten Inhibitoren auf die lichtabhaengige PGS-Reduktion geprueft.

Actinomycin, Chromomycin und Distamycin beeinflussen dabei diese Reaktion kurzfristig nicht (siehe Tabelle 8). Die empfindliche Photosynthesereaktion, zu deren Ablauf das geordnete Ineinandergreifen einer Vielzahl von Reaktionen notwendig ist wird nicht gehemmt. Diese Antibiotika wirken also in der verwendeten Konzentration mit hoher Wahrscheinlichkeit spezifisch auf die RNA-Synthese. Wie oben erwaehnt, wird die lichtabhaengige PGS- Reduktion durch Aethidiumbromid gehemmt. Da der primaere Wirkort der Inhibition von DNA- und RNA- Synthese in Chloroplasten bei diesem Stoff unklar ist, sollte er zur

Definition dieser Reaktionen nicht weiter in Betracht gezogen werden. Diese Vorsichtsmassnahme gilt auch fuer andere Systeme, besonders aber fuer in-vitro Versuche bei Mitochondrien (s.o.).

Tabelle 8:Einfluss von RNA-Synthesehemmstoffen auf die lichtabhaengige Phosphoglyceratreduktion. Die Aktivitaet ist in uMol/mg Chlorophyll/Stunde angegeben.

isolierte Chloroplasten ohne Zusatz:		87
Zusatz von	20 ug/ml Actinomycin D	keine Aenderung
	20 ug/ml Chromomycin	keine Aenderung
	2 ug/ml Distamycin	keine Aenderung
	10 ug/ml Aethidiumbromid	19

Produktanalyse

Zur weiteren Charakterisierung des Syntheseprodukts wurde nach der Inkubation die RNA extrahiert und ueber Polyacrylamidgele nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Absorption der Gele wurde bei 260 nm registriert. Die Gele wurden anschliessend in 1mm-Scheibchen zerschnitten und das Radioaktivitaetsprofil dem Absorptionsprofil zeichnerisch ueberlagert. Das Ergebnis eines typischen Einbauversuchs mit einer Inkubationszeit von 40 Minuten ist in Abb. 5 dargestellt. Die Hauptpeaks im optischen Profil sind in der Reihenfolge absteigenden Molekulargewichts DNA, p23s RNA, 23s ribosomale RNA, 16s ribosomale RNA und 5s/4s RNA. Driesel (1975) hat die Identitaet der genannten Komponenten ausfuehrlich diskutiert. Unter den beschriebenen Inkorporationsbedingungen sind mehrere radioaktive Peaks erkennbar. Die Hauptmenge der Inkorporation liegt in Bereichen, in denen nach dem relativ unempfindlichen optischen Profil bei ueblicher Beladung des Gels keine RNA festgestellt werden kann. Die Molekulargewichte der radioaktiven Peaks liegen bei ungefaehr 2.7, 2.0, 1.2, 0.7, 0.65, 0.56 und 0.45 Megadalton sowie im Bereich kleiner 33 Kilodalton. Diese Molekulargewichtsangaben sind als Schaetzwerte zu betrachten, da Verzerrungen durch moegliche Sekundaerstrukturen ausser Betracht gelassen wurden.

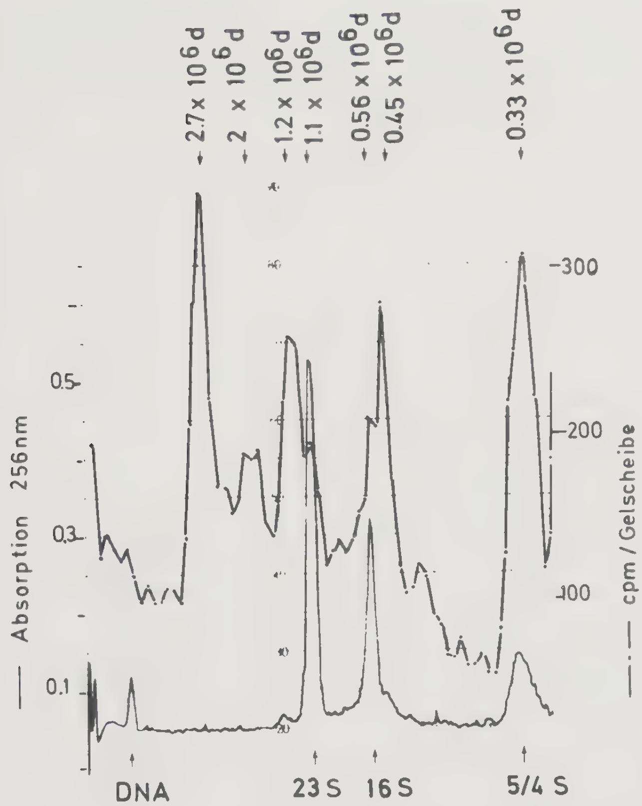


Abbildung 5:Auftrennung von RNA-Syntheseprodukten in einem Polyacrylamidgel. Die Chloroplasten waren fuer 40 Minuten inkubiert. Die Wanderungsrichtung war von links nach rechts. Die Syntheseprodukte vom Molekulargewicht <33 Kilodalton haben das Gel zum Teil schon verlassen (vergleiche Abbildung 6).

Sieht man von dem Peak <4s ab, der sehr wahrscheinlich aus Nukleosidtriphosphaten besteht (Richter und Grotha,1974), so synthetisieren isolierte Spinatchloroplasten also mindestens sieben durch ihr Molekulargewicht unterscheidbare Produkte, darunter solche von der Groesse der 23s (1.1 Megadalton) und der 16s (0.56 Megadalton) ribosomalen RNAs.

Das Vorhandensein diskreter RNA-Groessenklassen erlaubt nicht a priori den Schluss, es handle sich um direkte Transkripte von der Chloroplasten-DNA. Aus anderen Systemen ist bekannt, dass die endgueltig funktionelle RNA aus wesentlich groesseren Vorstufen herausgeschnitten werden kann (z.B. Duncan und Gorini,1975), oder

dass posttranskriptionell Nukleotide angefuegt werden koennen (Perry,1976). Um Hinweise zu erhalten, ob zwischen beobachteten Peaks Vorstufe/Produktbeziehungen bestehen, oder ob sie einzeln und unabhaengig voneinander transkribiert werden, verglich ich die Radioaktivitaetsprofile nach verschiedenen Inkubationszeiten. Abbildung 6 zeigt vier Kurven aus einem Experiment mit Probenentnahme bei 15, 30, 45 und 60 Minuten.

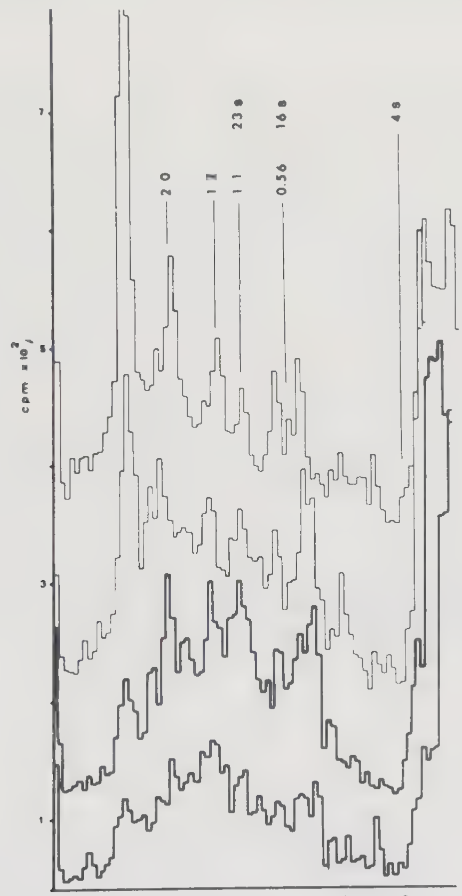


Abbildung 6: Radioaktivitaetsprofile nach den Inkubationszeiten (von unten) von 15, 30, 45 und 60 Minuten (siehe Text). Das Absorptionsprofil (vergleiche Abb.5) ist nicht dargestellt. Die Kurven sind in Ordinatenrichtung verschoben, um das Bild uebersichtlicher zu gestalten. Der 'Background' der Proben war vergleichbar.

Wie auf Grund der linearen Einbaukinetik zu erwarten war, nimmt insgesamt betrachtet die Radioaktivitaetsmenge im Gel mit der Zeit zu. Obwohl also die Gesamteinbaurate nach den Kriterien der Saeurefaellbarkeit und der Radioaktivitaetsmenge auf dem Gel - mit Ausnahme der Region <4s - konstant bleibt, aendert sich zu

den verschiedenen Zeiten die relative Menge an Radioaktivitaet in den einzelnen Banden:

- Das Radioaktivitaetsprofil der 15-Minuten-Probe ist beherrscht durch einen saeureloeslichen Peak in der Region <4s (entsprechend ca. 33 Kilodalton) der, wie oben erwaehnt, wahrscheinlich zum groessten Teil aus Nukleosidtriphosphaten und vielleicht zum kleineren Teil aus naszierenden RNA-Ketten besteht. Die restliche Aktivitaet verteilt sich relativ breit auf den Bereich zwischen 2 und 0.45 Megadalton mit einer kleinen Spitze ueber der 23s ribosomalen RNA. Ein weiterer Peak wandert mit der DNA.

- Nach 45 Minuten zeigt sich ein starker Einbau in der Region von 2.7 Megadalton. in dem bei der 15-Minuten-Probe noch relativ wenig gegliederten Bereich von 2 Megadalton bis etwa 4s sind nun Peaks feststellbar, am deutlichsten jene mit dem ungefaehren Molekulargewicht von 2.0, 1.2, 0.7, 0.65 und 0.45 Megadalton. Es wird angenommen, dass die direkten Vorstufen der ribosomalen RNAs (1.1 und 0.56 Megadalton) beim Molekulargewicht von 1.2 und 0.65 Megadalton bandieren (z.B. Bohnert et al.,1974).

- Nach 60 Minuten erhoehte sich die Einbaumenge weiter und die Peaks traten schaerfer hervor. Dabei war bei der Komponente von 2.7 Megadalton ein ueberproportionaler Anstieg zu verzeichnen.

Die relative Einbaumenge in den einzelnen Peaks zu verschiedenen Zeiten ist fuer die Hauptkomponenten noch einmal uebersichtlicher in Abb. 7 in einer Kinetik mit sechs Messpunkten dargestellt.

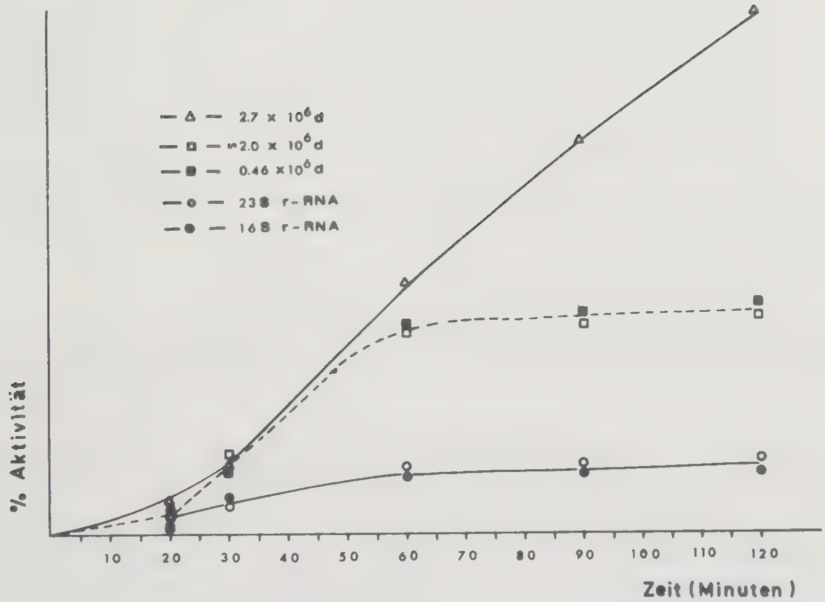


Abbildung 7:Relative Verteilung der Radioaktivitaet in RNA-Groessengewichtsklassen in Abhaengigkeit von der Zeit (siehe Text).

Es zeigt sich, dass die Markierung der einzelnen RNA-Groessenklassen zeitlich unterschiedlich verlaeuft. Bis zu einer Stunde waechst die Radioaktivitaet in allen Komponenten an. Dann stagniert der Einbau in den ribosomalen RNAs und im Bereich von 2 sowie im Bereich von 0.45 Megadalton, waehrend die Synthese der 2.7 Megadalton-Spezies weiterhin linear verlaeuft. In der Synthese der Komponenten von 2.0, 1.1, 0.56 und 0.45 Megadalton scheinen also Bindungen zu bestehen, die wohl entweder regulatorischer Natur sind, oder Vorstufe/Produkt Beziehungen darstellen.

Die Daten liessen sich mit folgendem hypothetischen Modell in Einklang bringen:

- Das einzige primaere Syntheseprodukt im Molekulargewichtsbereich >5s ist die Komponente von 2.7 Megadalton.

- Die weiteren Produkte gehen durch 'Processing' aus dem 2.7 Megadalton Transkript nach folgendem Schema hervor:

```
                 1.2 (p23s) --> 1.1  (23s)
           2.0
                 0.65 (p16s) --> 0.56 (16s)
2.7
           0.7 --> 0.45 und kleinere Produkte
```

- Die Transkription ist stabiler als das 'Processing'. Aus diesem Grund haeuft sich bei laengerer Versuchsdauer die 2.7 Megadalton-Vorstufe an.

Dieses Modell wird auch durch Hartleys und Ellis' (1974) Ergebnisse mit KCl-haltigen Medien gestuetzt, die ich reproduzieren konnte. Obwohl die Gesamtsyntheserate im Salzmedium anfaenglich hoeher liegt (Tab. 9), wird fast ausschliesslich der 2.7 Megadalton-Peak synthetisiert. Der schaedigende Einfluss von hohen KCl-Konzentrationen (Tab. 6) beeintraechtigt offenbar das 'Processing'.

Tabelle 9: Einfluss von 200 mM KCl auf den Einbau von 3H-Uridin in isolierte Chloroplasten. Der Einbau ist in CPM/mg Chlorophyll angegeben.

ohne KCl nach 20 Minuten	9200
mit KCl nach 20 Minuten	14500
ohne KCl nach 90 Minuten	27000
mit KCl nach 90 Minuten	29100

Diese Hypothese konnte von Bohnert et al. (1974) durch Experimente unter Chase-Bedingungen untermauert werden. Bohnert et al. konnten zeigen, dass in diesen Versuchen das Verschwinden der 2.7 Megadalton-Komponente von einer Anreicherung der ribosomalen RNAs begleitet war, obwohl eine vollstaendige Umwandlung in ribosomale RNA wegen der Empfindlichkeit des 'Processing' und der Poolgroesse der der radioaktiven Vorstufen nicht gelang. Kompetitive Hybridisierungen zeigten darueberhinaus, dass zwischen den ribosomalen RNAs und dem 2.7 Megadalton Transkript Sequenzhomologien im zu erwartenden Ausmass

bestehen (Bohnert et al.,1976).

Der experimentelle Ansatz der lichtabhaengigen RNA-Synthese mit Nukleosidvorstufen in funktionell gut erhaltenen Organellen hat sich als gutes Werkzeug erwiesen, um die Synthese der chloroplasteneigenen ribosomalen RNAs aufzuhellen. Es ist zu hoffen, dass er empfindlich und spezifisch genug ist, in Zukunft auch die nun anstehende Frage nach der Synthese von messenger-RNA in Chloroplasten beantworten zu helfen. Dies wird neben der Proteinanalyse die zentrale und wohl zugleich schwierigste Aufgabe der naechsten Zeit sein.

Fraction-1-Protein

Fraction-1-Protein wurde von Wildman und Bonner 1947 erstmals beschrieben. Es ist mengenmaessig das haeufigste Protein in der Natur (Ellis,1973), loeslich und befindet sich im Stroma der Chloroplasten (Kawashima und Wildman, 1970;siehe aber auch Sprey,1976). Es besitzt die Enzymaktivitaeten Ribulose 1, 5 Bisphosphatcarboxylase und Ribulose 1, 5 Bisphosphatoxygenase und stellt somit eines der Schluesselenzyme in der Dunkelreaktion der Photosynthese und in der Photorespiration dar.

Fraction-1-Protein ist ein multimeres Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 560 000 dalton. Setzt man es dem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS), hohen Harnstoffkonzentrationen oder alkalischem pH aus, so zerfaellt es in zwei Klassen von Untereinheiten mit Molekulargewichten von 56000 und je nach Spezies zwischen 13-16000 dalton, die sich elektrophoretisch voneinander trennen lassen (Rutner und Lane,1967). Jede der Untereinheiten kann wiederum heterogen sein. Fokussiert man sie in einem pH-Gradienten unter denaturierenden Bedingungen, dann spaltet die grosse Untereinheit in drei Molekuelpopulationen auf, die in jeweils nur einer Ladungseinheit unterschieden sind. Die kleine Untereinheit ist je nach Spezies entweder homogen oder besteht aus zwei ladungsverschiedenen Subklassen (Chen et al.,1976).

In den letzten Jahren setzte sich aufgrund genetischer und molekularbiologischer Studien in der Literatur die Ansicht durch, dass die Polypeptidkette der kleinen Untereinheit im Kern, die der grossen hingegen in der Plastide codiert sei.
Fraction-1-Protein waere so das erste Beispiel, dass Chloroplasten-DNA fuer funktionelle Proteine codieren kann und damit das erste konkrete Modellsystem zum Studium der Kooperation der genetischen Systeme von Kern und Plastide. Die Argumentationskette ist jedoch in einigen wesentlichen Punkten noch nicht geschlossen.

Die genetische Evidenz fuer das Modell der verschiedenen Codierungsorte wurde im wesentlichen in Wildmans Labor erbracht. Verschiedene Nicotianaarten wurden mit den sensitiven Methoden der zweidimensionalen Chromatographie nach tryptischer Verdauung ('Fingerprinttechnik') und mit Elektrofokussierung auf Merkmale in den grossen und kleinen Untereinheiten untersucht. Wildman und Mitarbeiter fanden, dass die Polypeptidketten der kleinen Untereinheiten interspezifisch relativ grosse Unterschiede aufwiesen, waehrend die Polypeptidketten der grossen Untereinheiten interspezifisch fast identisch waren, also eine hoehere evolutionaere Stabilitaet aufwiesen. Bei Kreuzungen wurden die Eigenschaften der genetisch instabileren kleinen Untereinheit biparental, die der grossen Untereinheit aber maternal vererbt. Wildman schloss daraus, dass die kleine Untereinheit im Kern codiert sei, waehrend die grosse Untereinheit von extrakaryotischen Genen, also hoechstwahrscheinlich von Chloroplasten-DNA stamme (Chan und Wildman,1972).

In Ellis und Jagendorfs Gruppen wurde dieses Modell mit biochemischen Mitteln untermauert. Sie gingen davon aus, dass Plastide und Cytosol verschiedene Translationssysteme besitzen, die allgemein nach den Sedimentationskonstanten ihrer Ribosomen - 80s-System fuer das Cytosol und 70s-System fuer die Plastide - benannt werden. Nimmt man an, dass die grosse Untereinheit in der Plastide, die kleine hingegen im Kern codiert ist, so ist es naheliegend, dieses Modell durch eine Hypothese ueber den Ort der Translation zu erweitern. Im einfachsten Fall muesste die grosse Untereinheit dann am 70s-, die kleine am 80s-System synthetisiert werden (Blair UND Ellis,1973;Gooding et al.,1973).

Blair und Ellis (1973) untersuchten daher den lichtabhaengigen Einbau von 35S-Methionin in isolierte, intakte Chloroplasten. Sie konnten zeigen, dass das Hauptsyntheseprodukt ein Molekulargewicht vergleichbar der grossen Untereinheit besass. Nach tryptischer Verdauung traten im Fingerprint-Chromatogramm radioaktive Produkte an den fuer die grosse Untereinheit typischen Stellen auf.

Auch fuer die kleine Untereinheit gibt es Daten, die dieses Modell stuetzen. Gooding und Mitarbeiter (1973) untersuchten isolierte 80s Polysomen mit spezifischen Antikoerpern auf das Vorhandensein von kleiner Untereinheit. Durch Immunopraezipitation konnten sie die Polypeptidkette der kleinen Untereinheit in statu nascendi nachweisen.

Luecken des Zwei-Codierungsorte-Modells

Wildman und Mitarbeiter stuetzen ihre Argumentation bei ihren genetischen Versuchen auf die Vererbung biochemischer Merkmale der jeweiligen Untereinheiten des Enzyms. Bei maternalem Erbgang eines Merkmals kann jedoch nicht zwingend geschlossen werden, dass sich das Strukturgen ausserhalb des Kerns befinde, da nicht auszuschliessen ist, dass ein plastomcodierter Regulationsfaktor - der maternal vererbt wuerde - verschiedene Kerngene oder Allele schaltet und so fuer einen nicht-mendelnden Erbgang eines strukturmaessig kerncodierten Phaenotyps verantwortlich waere.

Ellis selbst weist darauf hin, dass sein Proteinsynthesesystem in isolierten Chloroplasten unabhaengig von gleichzeitiger RNA-Synthese ist (Blair und Ellis,1973). Die Plastiden benutzen offensichtlich bereits vorliegende mRNA oder es fand nur noch 'run-off' Translation statt. Es ist also unklar, woher die mRNA stammt. Die Translation eines mRNA-Vorrats, der in vivo aus dem Kern in die Plastide transferiert wurde und dort in vitro verbraucht wird, ist nicht ausgeschlossen.

Umgekehrt folgt auch aus Jagendorfs Befund, dass die kleine Untereinheit an cytosolischen Ribosomen synthetisiert wird, natuerlich nicht streng, dass die mRNA aus dem Kern stammt.

Experimentelle Strategie mit der Gattung Oenothera

Die Moeglichkeit zu einem experimentellen Neuansatz in dieser Fragestellung bot sich an unserem Institut durch die Untersuchung der Gattung Oenothera. Die herausragenden Besonderheiten dieser Pflanze sind (Kutzelnigg und Stubbe,1974) :

- Plastiden beider Eltern werden auf die Nachkommenschaft uebertragen.

- Es gibt bei der Untergattung Euoenothera drei Genotypkomplexe, die A, B und C genannt werden und die natuerlich oder durch Kreuzung zu sechs diploiden Grundgenotypen kombiniert werden koennen. Ausserdem gibt es wenigstens fuenf Wildplastome, die mit den roemischen Ziffern I-V benannt werden. Es ist moeglich, einen bestimmten Genotyp mit verschiedenen Plastomen auszustatten und umgekehrt gleiche Plastome verschiedenen Kernen zuzuordnen.

- Die meiotische Rekombinierbarkeit der Kerngene ist stark eingeschraenkt (Komplexheterozygotie).

- Es existiert ein Sortiment von etwa 50 Plastom-Defektmutanten, die mit einer roemischen Ziffer nach dem Wildplastom von dem sie stammen und zusaetzlich mit einem griechischen Buchstaben benannt werden. Die bekannten Plastommutationen verursachen in Oenotherablaettern morphologische und physiologische Defekte verschiedener Intensitaet. Obwohl die primaere Ursache dieser Pigmentdefekte unbekannt ist, erschien es angesichts der grossen Zahl von Mutanten doch aussichtsreich, nach veraenderten Fraction-1 Phaenotypen zu suchen.

Eine Uebersichtsuntersuchung an diesem Material verfolgte zwei Ziele:

- Genetische Merkmale zu finden, an denen die Theorie von den zwei Codierungsorten fuer Fraction-1-Protein zu ueberpruefen waere und

- Kriterien fuer die Auswahl derjenigen Mutanten zu liefern, die einer direkten molekularbiologischen Untersuchung nach dem Codierungsort unterzogen werden sollten.

Dazu wurden zwei verschiedene experimentelle Ansaetze gewaehlt. Zum ersten wurde aus rohen Blattextrakten die Enzymaktivitaet der RUBPCase bestimmt, zum anderen wurde das Fraction-1 Molekuel gelelektrophoretisch nachgewiesen und auf Anwesenheit, Menge und Abweichungen in Ladung und/oder Molekulargewicht untersucht.

Bestimmung der RUBPCase-Aktivitaet

Oenotherapflanzen enthalten Stoerstoffe, die enzymatische Tests erschweren. Zu nennen sind hier Schleimstoffe, Tannine und phenolische Substanzen. Um Artefaktmoeglichkeiten weitgehend einzuschraenken, setzte ich dem Inkubationsmedium (Lilley UND Walker,1974) 2% PVP zu , welches Gerbstoffe und Phenole bindet (Schneider und Hallier,1970). Die RUBPCase-Reaktion wird von PVP nicht gestoert. Weiterhin war der Versuchsgang auf groesstmoegliche Schnelligkeit ausgelegt. Die Messung begann 3-4 Minuten nach der Homogenisation des Blatts. Wegen der grossen Variabilitaet im Pigmentgehalt der Mutanten wurden die Messungen nicht auf Chlorophyllmenge, sondern auf Frischgewicht bezogen.

Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Mutanten zeigen eine ausserordentlich hohe Variabilitaet in der RUBPCase-Aktivitaet, die im Falle von I beta und I delta die des Wildtyps sogar uebersteigt. Es gab auch Mutanten, die keine Aktivitaet zeigten (I ny, I sigma).

Tabelle 10: RUBPCase-Aktivitaet von Oenotheramutanten. Die Einheit ist uMol CO2 fixiert/mg Frischgewicht/Stunde.

Wildtyp Oenothera hookeri, Plastom I		0.054
Plastom I, Mutante	alpha	0.029
	beta	0.076
	delta	0.113
	zeta	0.004
	eta	0.057
	my	0.029
	ny	0.000
	sigma	0.000
Plastom II, Mutante	alpha	0.014
	beta	0.038
	gamma	0.065
	delta	0.045
	epsilon	0.003
	zeta	0.025
	eta	0.058
	kappa	0.055
Plastom III, Mutante	alpha	0.008
	beta	0.045
	delta	0.015
Plastom IV, Mutante	alpha	0.038
	beta	0.003
	delta	0.065
Plastom V, Mutante	alpha	0.002
	beta	0.061
	delta	0.063

Die RUBPCaseaktivitaet war nicht mit der Ergruenungsfaehigkeit korreliert. So gab es eine weisse (I ny) und eine vom Wildtyp schwer unterscheidbare gruene (I sigma) Mutante, die beide keine RUBPCaseaktivitaet zeigten, waehrend es ebenfalls weisse und gruene Mutanten gab, die eine relativ hohe Aktivitaet aufwiesen.

Da das Testsystem mit dem Ausgangssubstrat Ribose-5-Phosphat arbeitet und so auch die Aktivitaeten der Ribose-5-Phosphatisomerase sowie der Ribulose-5-Phosphatkinase misst, wurde durch Zusatz dieser beiden Enzyme geprueft, dass der Defekt nicht an diesen Reaktionen lag. Ein weiterer moeglicher Einwand, die Wirkung von inhibitorischen Substanzen, wurde durch Cohomogenisation mit Spinatblaettern in verschiedenen Mischungsverhaeltnissen ausgeschlossen. Aus diesen Gruenden schloss ich, dass bei den genannten Mutanten nur inaktive oder

gar keine RUBPCase vorhanden ist.

Gelelektrophoretische Untersuchungen auf Fraction-1 Mutationen

Aus den RUBPCase-Aktivitaetstests allein kann noch keine Aussage darueber gemacht werden, ob eine gegebene positive oder negative Abweichung von der Wildtypaktivitaet auf regulatorische Einfluesse - also zum Beispiel Aenderungen in der Enzymkonzentration - oder auf strukturelle Einfluesse - also ein in gleicher Menge vorhandenes, in seiner Struktur aber veraendertes Enzym - zurueckzufuehren ist. Um diese Alternativen zu unterscheiden war das zweite Testsystem noetig, naemlich die elektrophoretische Auftrennung der loeslichen Proteine in 4-20 % Polyacrylamid-Gradientengelen (Tab. 11). Durch die lange Dauer des Laufs von 12-14 Stunden erreichten die Proteine eine Vernetzungszone, die ein weiterwandern fast unmoeglich machte ('near-stop-position'). Der Trennparameter in einem solchen Fall ist hauptsaechlich das Molekulargewicht. Diese Methode hat den Vorzug, dass im Endstadium des Laufs eine Bandenschaerfung eintritt und dass daher Verunreinigungen aus den Rohhomogenaten im Probenpuffer als Stoersubstanzen weniger ins Gewicht fallen. Dafuer muss in Kauf genommen werden, dass mit dieser Methode kaum Aussagen ueber Ladungsverschiedenheiten gemacht werden koennen.

Im Gehalt an Fraction-1-Protein bestaetigte sich auch hier eine ausserordentliche Variabilitaet. Die Menge an Fraction-1-Protein pro Gewichtseinheit Blatt korrelierte ebenfalls nicht mit dem Pigmentgehalt. So zeigten manche Mutanten sehr wenig Fraction-1-Protein (I jota, I ny, IV beta), andere enthielten etwa soviel wie der Wildtyp (z.B. I beta, I zeta, II gamma, III delta). Ausserdem waren kontinuierlich alle Zwischenstufen vertreten. Als besonders interessant erwiesen sich zwei Mutanten (I sigma, V alpha), bei welchen ich trotz Ueberladung der Gele keine Bande an der Stelle finden konnte, zu der Wildtyp Fraction-1-Protein wandert. Es erschienen auch keine zusaetzlichen Banden bei diesen Mutanten (Abb. 8). Wurde Mutantenmaterial mit Wildtyp in verschiedenen Gewichtsverhaeltnissen cohomogenisiert, so erschien die Fraction-1-Bande in der erwarteten Intensitaet. Da sich auch alle anderen Banden an den dem Wildtyp entsprechenden Stellen befanden, ist ein unspezifischer Effekt dieser Mutanten auf die Extrahierbarkeit oder die Wanderungsgeschwindigkeit unwahrscheinlich. Da hier eine Deletionsmutation nicht ausgeschlossen war, habe ich diese Mutanten naeher untersucht.

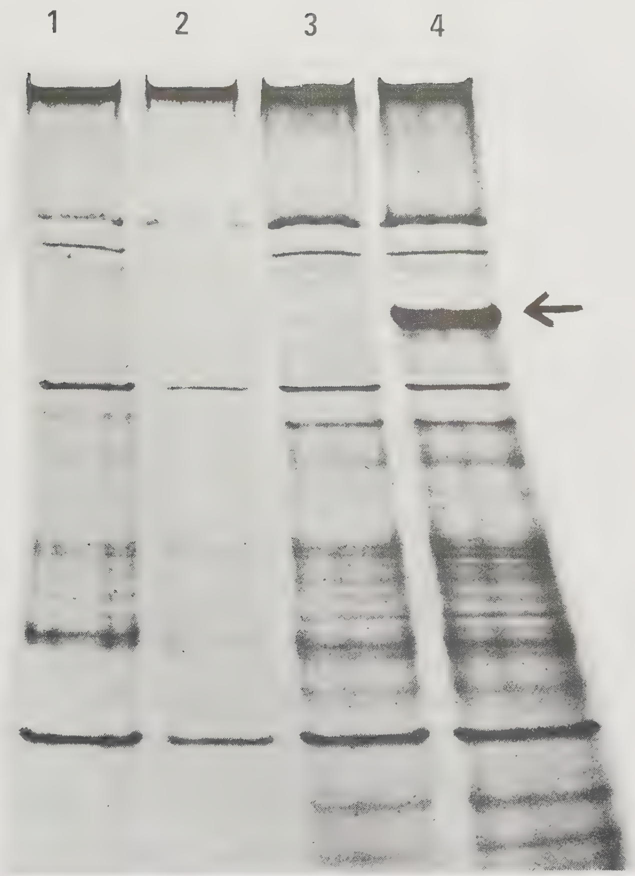


Abbildung 8: Auftrennung von loeslichen Proteinen aus Oenothera-Mutanten in einem nicht denaturierenden Gel. 1: I sigma; 2: IV beta; 3: V alpha; 4: V alpha und Wildtyp cohomogenisiert im Verhaeltnis 9+1. Der Pfeil bezeichnet die Position von Fraction-1-Protein.

Tabelle 11: Gelelektrophoretischer Nachweis von Fraction-1-Protein in Oenothera-Mutanten. Da die Faerbung mit Coomassie Blue nicht linear von der Proteinkonzentration abhaengig ist, wurde auf eine Quantifizierung verzichtet.

+ = Fraction-1-Protein vorhanden
- = kein Fraction-1-Protein nachweisbar
% = Fraction-1-Mutation (siehe Text)

Plastom I	,Mutante beta	+
	gamma	+
	delta	+
	epsilon	+
	zeta	+
	eta	+
	theta	+
	jota	+
	lambda	+
	my	+
	ny	+
	xi	+
	omikron	+
	pi	+
	sigma	-
	ypsilon	-
	phi	+
	psi	+
	omega	+
Plastom II	,Mutante beta	%
	gamma	+
	delta	+
	epsilon	+
	eta	+
	kappa	+
	lambda	+
	rho	+
Plastom III	,Mutante alpha	+
	beta	+
	gamma	+
	delta	+
	psi	+
	omega	+
Plastom IV	,Mutante alpha	+
	beta	+
	delta	+
Plastom V	,Mutante alpha	-
	gamma	+

Die Mutanten I sigma, I ypsilon, IV beta und V alpha

Folgt man der Zwei-Codierungsorte-Hypothese, so sind fuer die geordnete Synthese von Fraction-1-Protein mindestens folgende Teilleistungen der Zelle noetig:

a) Koordinierte mRNA-Synthese im Kern und in der Plastide
b) Translation an 80s bzw. 70s Ribosomen
c) Eventuell posttranslationales 'Processing' einer oder beider Untereinheiten
d) Transport der kleinen Untereinheit ueber die Plastidenhuellmembranen
e) 'Assembly' zum ganzen Molekuel.

Laesst sich gelelektrophoretisch kein Fraction-1-Protein nachweisen, so kann ein Defekt an jeder dieser Stellen liegen. Durch Gelelektrophoreseexperimente unter denaturierenden Bedingungen lassen sich - unter guenstigen Umstaenden - die Stoerstellen a-c von den Stoerstellen d und e unterscheiden. Sind naemlich Polypeptidketten vom Molekulargewicht der Untereinheiten nicht nachweisbar, so kann das als Hinweis auf einen Defekt in a oder b gelten. Sind Polypeptide vom Molekulargewicht der Untereinheiten vorhanden, so kann das auf eine Stoerung an Punkt d oder e hindeuten und sind schliesslich zusaetzliche Polypeptide von hoeherem Molekulargewicht zu finden, so deutet das auf einen Defekt bei c.

Untersucht man die Mutanten, bei denen wenig oder kein Fraction-1-Protein im 'nativen' Gel zu finden war, im denaturierenden SDS-Gel, so treten in der Tat zwei Typen auf (Abb.9):

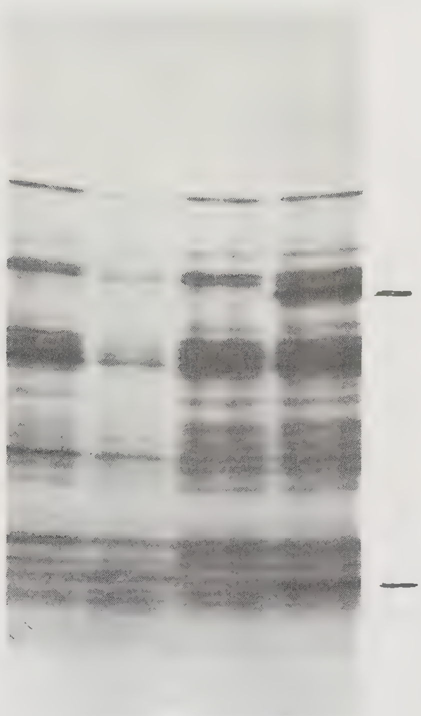


Abbildung 9:Auftrennung von Oenothera-Proteinen in einem SDS-Gel. Die Proben sind von links nach rechts: I sigma, IV beta, V alpha und V alpha und Wildtyp cohomogenisiert im Verhaeltnis 1+9. Die Proben stammen aus demselben Versuch wie die in Abbildung 8. Die Markierungen bezeichnen die Position der grossen (oben) und der kleinen (unten) Untereinheit.

Bei I sigma, I ypsilon und V alpha sind weder grosse noch kleine Untereinheiten nachweisbar. Der Schaden liegt hier wohl - wenn man von einem nicht naeher spezifizierbaren 'Regulationsdefekt' absieht - auf der Ebene a-b.

Die Mutante IV beta stellte sich als besonders interessant heraus. Hier sind, wie zu erwarten war, schwache Banden vom Molekulargewicht der Untereinheiten zu sehen. Zusaetzlich scheint eine Bande von etwa 18000 dalton Molekulargewicht in der Intensitaet gegenueber dem Wildtyp erhoeht (Abb. 10). Es ist denkbar, dass dieses Polypeptid einen 'Precursor' der kleinen

Untereinheit darstellt, dass mithin der Defekt bei c-e liegt. Dieses Muster trat bei IV beta im Sommer 1977 in vier unabhaengigen Experimenten auf. In einem weiteren Experiment, durchgefuehrt im Oktober 1977, waren weder das Holoenzym noch die Untereinheiten und die 18 Kilodalton Bande nachweisbar (Abb. 8 und 9). Da die Auswahl des Gewebes mit groesster Sorgfalt erfolgt war, ist es moeglich, dass diese Merkmalsauspraegung eine jahreszeitliche Abhaengigkeit zeigt.

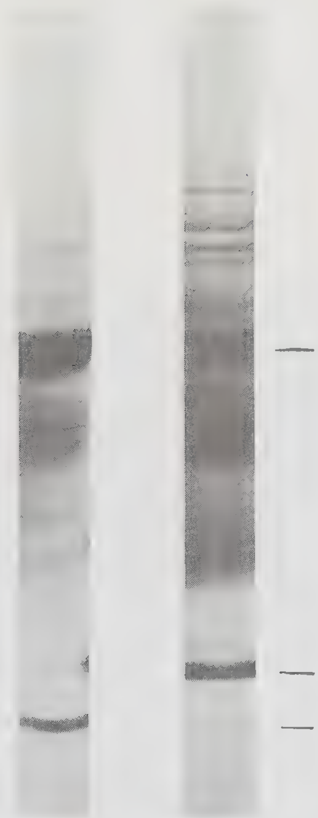


Abbildung 10: Auftrennung von Oenothera-Proteinen im SDS-Gel. Links: Wildtyp, rechts: IV beta. Markierungen von oben: Grosse Untereinheit, Bereich von etwa 18 Kilodalton, kleine Untereinheit.

Einen ueberraschenden Befund stellt die Tatsache dar, dass die kleine Untereinheit in den Oenothera-Plastommutanten nicht synthetisiert wird, wie das Feierabend (1976) bei temperatursensitivem Roggen beobachtet, bei dem unter hoher Temperatur keine plastideneigenen Ribosomen gebildet werden. Der Defekt des Plastoms scheint bei Oenothera also - primaer oder sekundaer - beide Untereinheiten zu beeinflussen.

Die Mutante II beta

Fraction-1-Protein der Mutante II beta, die RUBPCaseaktivitaet besitzt (Tab. 10), zeigte als einziges eine veraenderte Wanderungsstrecke. Im Vergleich zum Wildtyp und den anderen Mutanten lief es etwas weiter ins Gel (Abb. 11). Dieses Verhalten laesst auf ein geringeres Molekulargewicht schliessen.

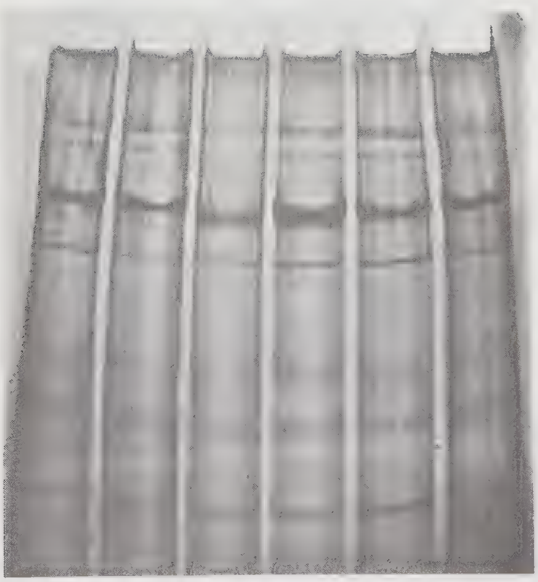


Abbildung 11:Auftrennung von loeslichen Proteinen aus Oenothera-Mutanten an einem nicht denaturierenden Gel. Die Proben sind von links nach rechts: I psi, I omega, II beta, II gamma, II delta und II epsilon.

Um zu pruefen, ob dieser Effekt auf einer Deletion in einer der Untereinheiten oder auf verschiedenes 'Assembly' von wildtypaehnlichen Untereinheiten zurueckzufuehren ist, reinigte ich II beta Fraction-1-Protein auf einem Breitbandgel und eluierte die Bande mit SDS.

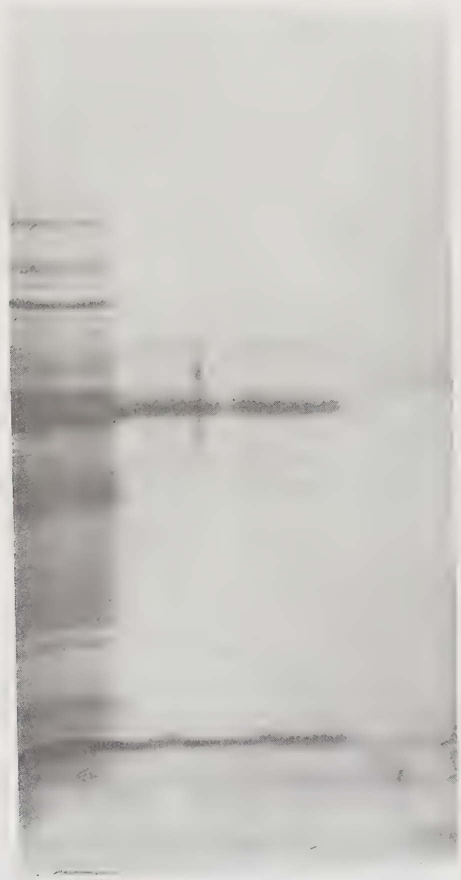


Abbildung 12: Auftrennung von Oenothera-Proteinen an einem SDS-Gel. Die Proben sind von links nach rechts: Wildtyp Plastom II, Rohpraeparation; Wildtyp, gereinigt; II beta, gereinigt. Die Nebenbanden in der gereinigten Proben sind auf Unreinheiten in den Chemikalien zurueckzufuehren (Vergleiche Tasche 4, ohne Probe).

Bei normaler Auftrennung im SDS-Gel (Abb. 12) wanderten sowohl die grosse wie auch die kleine Untereinheit an die dem Wildtyp entsprechenden Stellen. Dieses Verhalten wuerde auf eine Stoerung im 'Assembly' hindeuten.



Abbildung 13:Auftrennung von loeslichen Oenothera-Proteinen an einem SDS-Gradientengel bei verlaengerter Trenndauer (siehe Text). Die Proben sind von links: Wildtyp Plastom II und Mutante II beta. Der Kontrast dieser Aufnahme wurde durch Dunkelkammertechniken erhoeht. Es ist nur die Gelregion um die grosse Untereinheit gezeigt.

Verschaerft man die Trennbedingungen fuer die grosse Untereinheit indem man ein Gradientengel fuer etwa das dreifache der normalen Laufzeit unter Spannung haelt, so laesst sich beim Wildtyp die grosse Untereinheit in zwei nahe beieinanderliegende Banden auftrennen; II beta zeigt dagegen nur eine, die der hoehermolekularen Wildtypbande entspricht (Abb. 13). Diese Aufspaltung der grossen Untereinheit in zwei groessenverschiedene Subklassen ist nach meiner Kenntnis in der Literatur noch nicht beschrieben. Sie wurde allerdings auch schon in anderen Labors beobachtet (Ellis, persoenliche Mitteilung). Das Fehlen einer Groessensubklasse der grossen Untereinheit bei der Mutante kann unter anderem durch Deletion eines Gens, durch fehlerhaftes 'Processing' oder durch fehlerhaftes 'Assembly' verursacht sein. Mit den gegenwaertig verfuegbaren Daten kann zwischen diesen Moeglichkeiten nicht unterschieden werden.



Abbildung 14: Auftrennung von gereinigtem Fraction-1-Protein aus Oenothera in einem Polyacrylamidgel unter nicht denaturierenden Bedingungen. Bei starker Ueberladung des Gels (rechts, 30 ug Protein) werden noch Restkontaminationen sichtbar. Die Nachweisgrenze fuer Fraction-1-Protein liegt in diesem Gelsystem etwa zwischen 15 und 150 ng Protein (Daten hier nicht dargestellt).

Mit diesem Spektrum an Mutanten liegen die experimentellen Ansaetze zur Bearbeitung der Fragestellung nach der Kooperation von Genom und Plastom in der Biosynthese der Chloroplasten klar zutage.

Die Analyse muss sich dabei in zwei Richtungen bewegen:

1.)Durch die Erstellung von physikalischen Karten (Restriktionsanalyse) der Mutanten-DNAs und den Vergleich mit den entsprechenden Karten der Wildtypen ist festzustellen, ob

parallel mit den vermuteten Mutationen im Fraction-1-Protein Aenderungen in der DNA nachgewiesen werden koennen.

2.)Die Charakterisierung des Fraction-1-Proteins von Wildtyp und Mutanten muss - zum Beispiel durch 'Fingerprint-' oder immunologische Techniken - verbessert werden, um eine genauere Analyse der Defekte zu ermoeglichen. Diese Charakterisierung ist auch eine der Voraussetzungen fuer die Produktanalyse in einem DNA-abhaengigen Translationssystem.

Ein solches schwieriges aber moegliches Programm sprengt den Rahmen dieser Dissertation, an seiner Verwirklichung wird in unserem Labor allerdings gearbeitet. Ich habe im Rahmen dieses Projekts trotz biochemischer Schwierigkeiten (Holder,1976) schon die Reindarstellung von Fraction-1-Protein von Oenothera erzielt, die nun die Moeglichkeit der Antikoerperherstellung eroeffnet (siehe Abb. 14).

Zusammenfassung

Unser Bild von der genetischen Organisation der autotrophen eukaryotischen Zelle hat sich in den letzten Jahren grundlegend gewandelt. Neben dem Zellkern besitzt dieser Zelltyp naemlich mit Plastiden und Mitochondrien zwei weitere Kompartimente, die genetische Informationstraeger enthalten. In dieser Arbeit werden Fragen behandelt, wie plastidaere Erbtraeger erhalten und in Funktion umgesetzt werden. Dazu wurden die Prozesse (1) der DNA-Synthese und (2) der Transkription in isolierten Chloroplasten untersucht, sowie (3) das Fraction-1-Protein in Wildarten und extrakaryotischen Mutanten von Oenothera untersucht. Dieses Protein wird als Modell fuer das Zusammenspiel von Erbtraegern des Zellkerns und der Plastiden diskutiert.

(1)DNA-Synthese wurde in vitro untersucht, um Interferenz durch den Zellkern weitgehend auszuschalten. In der Literatur ist ein triphosphatabhaengiges DNA-Synthesesystem beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Ansatz zum Nachweis plastideneigener Nukleinsaeuresynthese nicht geeignet ist. Der wesentlichste Einwand ist, dass Triphosphatvorstufen nur von gebrochenen Chloroplasten inkorporiert werden, die auch extraplastidaeren loeslichen Polymerasen zugaenglich sind. Durch Modellexperimente mit bakterieller DNA-Polymerase konnte dieser Einwand erhaertet werden. Darueberhinaus zeigte die Produktanalyse, dass in diesem System neben der Chloroplasten-DNA auch verunreinigende Kern-DNA markiert sein kann.

Es wurde ein in-vitro-System entwickelt, mit dem die Frage nach der Lokalisation der DNA-Synthesereaktion im Organell eindeutig beantwortet werden konnte. Dieser Ansatz beruht auf Nukleosidvorstufen, die die Plastidenhuellmembranen permeieren koennen. Ihr Einbau ist streng lichtabhaengig und findet nur in intakte Chloroplasten statt. Er ist sensitiv gegen Entkoppler des Elektronentransports, aber insensitiv gegen DNAase, solange die Huellmembranen der Organellen intakt belassen werden. Chloroplasten-DNA ist das einzige markierte Produkt in diesem Ansatz.

(2) Der Vorteil des entwickelten in vitro Ansatzes wurde besonders beim Studium von Transkriptionsprozessen offenbar. Im Gegensatz zum triphosphatgetriebenen Ansatz gelang es, mehrere diskrete Syntheseprodukte zu fassen, die als Transkript und Reifungsprodukte der chloroplasteneigenen ribosomalen RNAs (23s und 16s RNA) gedeutet wurden. Folgendes Reifungsschema wurde vorgeschlagen (Einheit = Megadalton)

```
               ↗ 1.2 (p23s) --> 1.1  (23s)
          2.0
        ↗      ↘ 0.65 (p16s) --> 0.56 (16s)
    2.7
        ↘ 0.7 --> 0.45 und kleinere Produkte
```

Die Versuche belegen, dass (a) Organell-DNA genetisch aktiv ist, dass (b) die organelleigene ribosomale RNA als Transkriptionseinheit vorliegt, dass (c) Plastiden die Maschinerie des RNA-'Processing' enthalten und dass (d) Plastiden-DNA transkribierte 'Spacersequenzen' besitzt.

(3) Die Untersuchungen, die im dritten Teil dieser Arbeit beschrieben sind, dienten dazu, weitere Funktionen plastidaerer DNA zu identifizieren und Ansaetze fuer das Studium der Kooperation von Erbtraegern in Zellkern und Plastide zu finden. Dazu wurden Plastommutanten von Oenothera auf Mutationen im Fraction-1-Protein untersucht, dessen grosse Untereinheit nach neueren Daten auf der Plastiden-DNA und dessen kleine Untereinheit auf der Kern-DNA codiert ist. Fraction-1-Protein ist das mengenmaessig haeufigste Protein in der Natur. Es besitzt die Enzymaktivitaeten Ribulose 1, 5 Bisphosphat-Carboxylase und -Oxygenase und ist damit eines der Schluesselenzyme der Photosynthese. Die etwa 40 untersuchten Plastommutanten liessen sich in Bezug auf dieses Protein in drei Gruppen einteilen: (a) Mutanten, die das Enzym enthielten, (b) Mutanten, in denen das Enzym in modifizierter Form vorlag und (c) Mutanten in denen kein Enzym nachweisbar war.
Die genauere Analyse der letztgenannten Gruppen ergab, dass das Plastom wohl nicht nur fuer das Strukturgen der grossen Untereinheit des Fraction-1-Proteins codiert, sondern moeglicherweise auch 'Assembly'-Prozesse und die Regulation der Synthese der kleinen Untereinheit im Cytosol beeinflusst.

Verzeichnis der verwendeten Literatur

Anet, R. und Strayer, D.R. (1969)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 52-58

Arnon, D.J. (1949)
Plant Physiol. 24, 1-15

Bedbrook, J.R. (1977)
Colloq. Intern. C.N.R.S. 261, 53-61

Bedbrook, J.R. und Bogorad, L. (1976)
in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria
(Buecher, T. et al. eds.) Amsterdam, 369-373

Bedbrook, J.R. und Bogorad, L. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. US 73, 4309-4313

Behn, W. und Herrmann, R.G. (1977)
Molec. Gen. Genet. 157, 25-30

Bishop, D.H.L., Claybrook, J.R. und Spiegelman, S. (1967)
J. Mol. Biol. 26, 373-387

Blair, G.E. und Ellis, R.J. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 319, 223-234

Bohnert, H.-J. und Schmitt, J.M. (1974)
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 355, 11-12

Bohnert, H.-J., Schmitt, J.M. und Herrmann, R.G. (1974)
Portugaliae Acta Biologica 14, 71-90

Bohnert, H.-J., Schmitt, J.M. und Herrmann, R.G. (1975)
10. FEBS-Kongress, Paris

Bohnert,H.-J., Driesel, A.J. und Herrmann, R.G. (1976)
in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria
(Buecher,T. et al. eds.) Amsterdam, 629-636

Brown, R.D., Bastia, D. und Haselkorn, R. (1970)
in: RNA Polymerase and Transcription, (Silvestri, L. ed.)
Amsterdam und London, 309-328

Butterfass, T.(1973)
Protoplasma 76, 167-195

Carritt, B. und Eisenstadt, J.M. (1973)
Eur. J. Biochem. 36, 482-488

Chan, P. und Wildman, S.G. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 277, 677-680

Chen, K., Jchal, S. und Wildman, S.G. (1976)
in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria
(T.Buecher et al., eds.) Amsterdam, 3-11

Chun, E.H.L., Vaughan, M.H. und Rich, A. (1963)
J.Mol.Biol. 7, 130-141

Crouse, E.J., Bohnert, H.-J., Driesel, A.J. und Herrmann, R.G.
(1977)
in: Progress on Regulation of Developmental Processes in Plants,
Section1, Halle

Driesel, A.J. (1975)
Diplomarbeit, Universitaet Koeln

Duncan, M.J. und Gorini, L. (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. US 72, 1533-1537

Dyer, T.A. und Bowman, C.M. (1976)
in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria
(Buecher, T. et al. eds.) Amsterdam, 645-651

Ellis, R.J. (1973)
Comm. Plant Sci. 1, 29-38

Feierabend, J. (1976)
in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria
(Buecher, T. et al., eds.) Amsterdam, 99-102

Gibor, A. (1967)
in: Biochemistry of Chloroplasts(T.Goodwin, ed.)321-328

Gilbert, W. (1976)
in: RNA-Polymerase (Losick, R. und Chamberlin, M. eds)
Cold Spring Harbor, 193-205

Goldberg, I.H. und Friedman, P.A. (1971)
Ann. Rev. Biochem. 40, 775-810

Gooding, R., Roy, H. und Jagendorf, T. (1973)
Arch.Biochem.Biophys. 159, 324-335

Gray, P.W. und Hallick, R.B. (1976)
in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria
(Buecher, T. et al. eds.) Amsterdam, 347-350

Hall, D.O. (1972)
Nature, New Biology 235, 125-125

Hartley, M.R. und Ellis, R.J. (1973)
Biochem. J. 134, 249-262

Heber, U. und Santarius, K.A. (1970)
Z.Naturforsch. Teil B 25, 718-728

Heber, U. (1973)
Biochim.Biophys.Acta 305, 140-152

Heber, U. und Purczeld, P. (1977)
Progr. 4th Int. Congr. Photosynthesis, Reading 107-118

Heldt, H.W. (1976)
Encycloped. Plant Physiol
(Stocking, C.R. und Heber, U. eds.) 3, 235-254

Herrmann, R.G., Bohnert, H.-J., Driesel, A. und Hobom, G. (1976)
in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria
(Buecher, T et al. eds.) Amsterdam, 365-372

Herrmann, R.G. und Kowallik, K.V. (1970)
Protoplasma 69, 365-372

Herrmann, R.G., Kowallik, K.V. und Bohnert, H.-J. (1974)
Portugaliae Acta Biologica 14, 91-110

Herrmann, R.G., Bohnert, H.-J., Kowallik, K.V. und Schmitt, J.M.
(1975)
Biochim. Biophys. Acta 378, 305-317

Herrmann, R.G., Bohnert, H.-J., Kowallik, K.V. und Schmitt, J.M.
(1975b)
10. FEBS-Kongress, Paris

Hobom, G., Bohnert, H.-J., Driesel, A. und Herrmann, R.G. (1977)
Colloq. Intern. C.N.R.S. 261, 63-69

Holder, A.A. (1976)
Carlsberg Res.Commun. 41, 321-334

Jensen, R.G und Bassham, J.A.(1966)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 56, 1095-1101

Kahn, A. und von Wettstein, D.(1961)
J. Ultrastruct. Res. 5, 557-566

Kalb, V.F. und Bernlohr, R.W. (1977)
Anal. Biochem. 82, 362-371

Kawashima, N. und Wildman, S.G. (1970)
Ann. Rev. Plant. Physiol. 21, 325-358

Kirk, J.T.O. (1971)
in: Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts
(Boardman, N.K. et al. eds.) Amsterdam, 267-276

Kolodner, R. und Tewari, K.K. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 402, 372-390

Kolodner, R. und Tewari, K.K. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 6355-6364

Kolodner, R. und Tewari, K.K. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 402, 372-390

Kowallik, K.V. und Herrmann, R.G. (1972)
J.Cell Sci. 11, 357-377

Kowallik, K.V. und Herrmann, R.G. (1974)
Portugaliae Acta Biologica 14, 111-126

Krause, G.H. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 460, 500-510

Kung, S.-D. (1977)
Ann.Rev.Plant Physiol. 28, 401-437

Kutzelnigg, H. (1972)
Radiation Bot. 12, 63-75

Kutzelnigg, H. und Stubbe, W. (1974)
Sub.-Cell. Biochem. 3, 73-89

Laemmli U.K. (1970)
Nature 227, 680-685

Lilley, R.Mcc. und Walker, D.A. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 358, 226-229

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, R.L. und Randall, J. (1951)
J. Biol. Chem. 193, 265-275

Manning, J.E., Wolstenholme, D.R. und Richards, O.C. (1972)
J. Cell Biol. 53, 594-601

Manning, J.E., Wolstenholme, D.R., Ryan, S.R. und Hunter, L.A.
(1971)
Proc. Natl. Acad. Sci. US 68, 1169-1173

Margolis, J. und Kenrick, K.G. (1968)
Anal.Biochem. 25, 347-362

Mattoccia, L.P. und Roberti, S. (1974)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 882-893

Meyer, R.R. und Simpson, M.V. (1969)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 34, 238-243

Michaelis, P. (1955)
Cytologia 20, 315-388

Parish, J.H. und Kirby, K.S. (1966)
Biochim. Biophys. Acta 129, 554-562

Perry, R.P. (1976)
Ann. Rev. Biochem. 45, 605-629

Puschendorf, B. (1971)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 617-624

Rabinowitz, H., Reisfeld, A., Sagher, D. und Edelman, M. (1975)
Plant Physiol. 56, 345-350

Ray, D.S. und Hanawalt, P.C. (1964)
J.Mol.Biol. 9, 812-824

Reisner, A.H., Nemes, P., Bucholtz, C. (1975)
Anal.Biochem. 64, 509-516

Renner, O.(1934)
Ber. Mat. Phys. Kl. Saechs. Akad. Wiss.
Leipzig 86, 241-266

Renner, O. (1946)
Naturwissenschaften 33, 211-218

Richter, G. und Grotha, R. (1974)
Planta 116, 273-278

Ris, H. und Plaut, W. (1962)
J.Cell Biol. 13, 383-391

Rutner, A.C. und Lane, M.D. (1967)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 28, 531-537

Sager, R. und Ishida, M.R. (1963)
Proc.Natl.Acad.Sci.US 50, 725-730

Sager, R. (1972)
Cytoplasmic Genes and Organelles. Academic Press, New York

Schaefer, G. (1975)
Dissertation, Universitaet Duesseldorf

Schmitt, J.M. und Herrmann, R.G. (1977)
Methods in Cell Biology (Ed.:D.Prescott)
Academic Press 15, 177-200

Schmitt, J.M. (1973)
Staatsexamensarbeit, Universitaet Heidelberg

Schmitt, J.M., Crouse, E.J., Driesel, A.J., Herrmann, R.G. und Bohnert, H.-J. (1977)
4th Int. Congress on Photosynthesis, Reading, 333

Schmitt, J.M. und Herrmann, R.G. (1974)
Hoppe Seylers Z. Physiol.Chem. 355, 83

Schmitt J.M. und Herrmann, R.G. (1975)
10. FEBS-Kongress, Paris

Schnarrenberger, C. und Fock, H. (1976)
Encyclop. Plant Physiol. (Stocking, C.R. und Heber, U. eds) 3, 185-234

Schneider, V. und Hallier, U.W. (1970)
Planta 94, 134-139

Spencer, D. und Whitfeld, P.R. (1967)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 538-542

Spencer, D. und Whitfeld, P.R. (1969)
Arch. Biochem. Biophys. 132, 477-488

Spencer, D., Whitfeld, P.R., Bottomley, W. und Wheeler, A.R. (1971)
in: Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts (Boardman, N.K. et al. eds.), 372-382

Sprey, B. (1976)
Z.Pflanzenphys. 78, 85-89

Swinton, D.C. und Hanawalt, P.C. (1972)
J. Cell Biol. 54, 592-597

Ter Schegget, J. und Borst, P. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 246, 239-248

Tewari, K.K. (1971)
Ann. Rev. Plant Physiol. 22, 141-168

Tewari, K.K., Kolodner, R., Chu, N. und Meeker, R.M. (1977)
Colloq. Intern. C.N.R.S. 12, 15-36

Tewari, K.K. und Wildman, S.G. (1967)
Proc. Natl. Acad. Sci. US 58, 689-69696

Walker, D.A. (1971)
in: Methods in Enzymology (San Pietro, a. Ed.) New York 211-220

Walker, D.A. (1976)
Encyclop. Plant Physiol. (Stocking, C.R. und Heber, U. eds.) 3, 85-136

Warburg, O. und Christian, W. (1942)
Biochem. Z. 310, 384-421

Wells, R. und Birnstiel, M. (1969)
Biochem. J. 112, 777-786

Whitfeld, P.R., Leaver, C.J., Bottomley, W. und Atchison, B.A. (1977)
Colloq. Intern. C.N.R.S. 261, 235-241

Wildman, S.G. und Bonner, J. (1947)
Arch. Biochem. Biophys. 14, 381-413

Lebenslauf

Name	Juergen Martin Schmitt
Geboren	am 20.8.1948 als Sohn des Bankkaufmanns Friedrich Schmitt und seiner Frau Ruth geb. Reinemuth in Weinheim
Schulen	1954 - 1958 Grundschule 1958 - 1967 Gymnasium, beides in Weinheim. Abitur am 21.6.1967
Studium	Ab Wintersemester 1967/68 Biologie (Hauptfach) Chemie und Physik (Nebenfaecher) an der Universitaet Heidelberg. Ab Wintersemester 1968/1969 Geographie als zweites Hauptfach

Zwischenpruefungen:

Biologie	SS	1969
Geographie	WS	1970/1971
Chemie	WS	1972/1973

2 Semester Tutorentaetigkeit an der Biologischen Fakultaet der Universitaet Heidelberg.

Staatsexamen am 13.2.1973,
Pruefung in Zoologie und Botanik.
Staatsexamensarbeit angefertigt am Max-Planck-Institut fuer Pflanzengenetik , Ladenburg. Titel 'DNA-Polymerase in isolierten Chloroplasten ?'

Seit SS 73 Promotionshoerer an der Universitaet Duesseldorf.